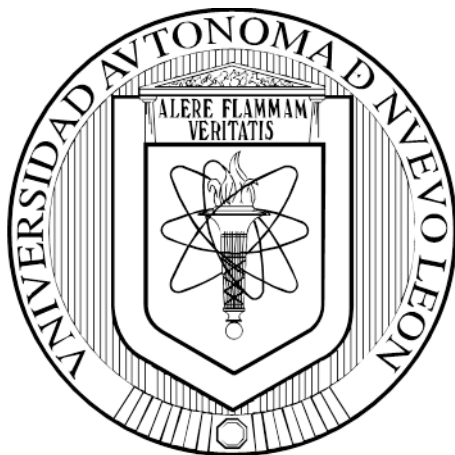


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE RIOLOZATRIONA
EN LA VÍA DE INFECCIÓN POR VHS-1**

POR

Q.C.B. DINORA ELIZABETH FERREL HERNÁNDEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA BIOMÉDICA**

SEPTIEMBRE, 2018

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE
RIOLOZATRIONA EN LA VÍA DE INFECCIÓN POR VHS-1**

Aprobación de la tesis:



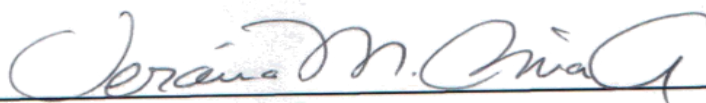
DR. C. DAVID ARTURO SILVA MARES

Director de tesis



DR. C. ERNESTO TORRES LÓPEZ

Co-director de tesis



DR. C. VERÓNICA MAYELA RIVAS GALINDO

Miembro de la comisión



DR. med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de Estudios de Posgrado

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE
RIOLOZATRIONA EN LA VÍA DE INFECCIÓN POR VHS-1**

Presentado por:

Q.C.B. DINORA ELIZABETH FERREL HERNÁNDEZ

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica y el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección del Dr. en C. David Arturo Silva Mares, la Co-Dirección del Dr. en C. Ernesto Torres López y como miembro de la comisión la Dra. en C. Verónica Mayela Rivas Galindo.

Número de aprobación comité de ética: QA17-00005



DR. C. DAVID ARTURO SILVA MARES

Director de tesis



DR. C. ERNESTO TORRES LÓPEZ

Co-director de tesis



DR. C. VERÓNICA MAYELA RIVAS GALINDO

Miembro de la comisión

DEDICATORIA

A la familia Ferrel Hernández, por creer en mí....

A Luis por el apoyo y amor incondicional....

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo por parte de UANL-PAICyT No. SA111-15 y SA657-18 Conacyt-Básicas No. 252846 y SEP-PRODEP No. DSA/103.5/16/10510.

A mi comisión de tesis:

Al Dr. C. David Silva, por su paciencia, por su ayuda, por enseñarme a trabajar con ensayos *in vitro*, por estar ahí cada vez que lo necesité, por cada consejo, sufrimos y aprendimos juntos, pero sin lugar a duda no pude tener mejor director. Muchas gracias por dejarme ser del equipo antiherpéticos.

Al Dr. C. Ernesto Torres, por cada platica amena, por todaaa su ayuda para que este proyecto saliera adelante y por aguantarme. Un gusto coincidir con personas como usted en esta vida.

A la Dra. C. Verónica Rivas, por traerme de regreso, gracias a usted me involucre en la investigación y gracias a su ayuda y paciencia estoy terminando una etapa más en mi vida, sin lugar a duda es la mejor doctora del mundo.

Y muy especialmente:

A mis padres por creer en mí y apoyarme en cada decisión que he tomado a lo largo de mi vida, nunca tendré como pagarles todo lo que han hecho por mí, este como cada logro que tenga en mi vida, será por y para ustedes.

A Luis, por ser mi soporte, por su paciencia, por su amor, por aguantar cada faceta a lo largo de estos dos años, por su ayuda en cada momento, esto hubiera sido más difícil si no estuvieras TU a mi lado, gracias, ¡Mi amor!

A mi hermana por simplemente ser la mejor del mundo. A ti y a Luis les agradezco también traer a este mundo a mi Valeria. A Abdiel, mi hermano pequeño, el dolor de cabeza de mi familia. Y a César, el mayor y el que pareciera ser el más inmaduro, pero no es así, eres un ejemplo de como se puede salir adelante, tu y mis 3 sobrinos son parte importante de mi vida. Nunca hemos sido de esos hermanos que se demuestren mucho cariño, pero saben que siempre podrán contar conmigo.

A mis abuelos, espero algún día pagarles todo lo que hicieron por mí en mi infancia.

A mis compañeros y ahora amigos de generación: Sara, Roberto y Víctor, quienes hicieron más llevadera esta etapa. Aprendimos, caímos y nos levantamos juntos, gracias por soportar cada drama, por cada risa y comida juntos. Sin lugar a duda extrañare compartir un lugar con ustedes en el cubículo, en cada laboratorio y hasta en la cafetería. Ojalá que el tiempo no desaparezca todo lo que tenemos hasta ahora.

A mis compañeros del cubículo: Omar, Perli, Juan, Mitzy y Yazmin, por aguantarme, (aunque uno más que otros), por escuchar mis quejas por todo y por hacer mi estancia en el departamento más amena.

A Jorge, no compartiste un lugar conmigo en el cubículo, pero si tienes un lugar muy especial en mi vida. Fuiste el mejor compañero de trabajo que pude tener, no tienes una idea de cuanto extraño nuestros desayunos en CIATEJ, esta tesis es también tuya, por que me apoyaste en mi decisión de regresar a Analítica. Sabes que siempre contarás conmigo.

A Ivonne, la mejor técnica del mundo, gracias por todo el tiempo y conocimiento compartido no solo estos 2 años, si no desde que llegue al laboratorio de extracción.

A Mariza, por nuestros complots contra el mundo y sobre todo por su ayuda en células.

A la Dra. C. Graciela Granados, por escucharme y ayudarme cuando tenía alguna duda independientemente del tema que fuera, muchas gracias!.

Al personal de inmunología Thomas, Pamela y Maye, gracias por arriesgarse a ayudarme, por compartir sus conocimientos conmigo, fueron parte fundamental al final de esta etapa y les estoy muy agradecida.

A Madeline y Jessica mi equipo Tosto!, agradezco haber coincidido con ustedes en la facultad, quien diría que una simple sociedad de alumnos te pudiera dejar tan buenas amistades, muchísimas gracias por su amistad.

A Gerardo, mi amigo de toda la vida, aunque no vive en Monterrey y no estuvo físicamente conmigo, siempre ha estado ahí cuando lo he necesitado y me ha ayudado a salir adelante. Gracias por todo.

A CONACYT por la beca de manutención otorgada los 2 años.

En fin, a cada persona que me ayudo para que esto saliera adelante les estoy sumamente agradecida.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Herpes	1
1.1.1 Estructura Viral	3
1.2 Epidemiología	5
1.3 Transmisión del VHS-1	6
1.4 Manifestaciones clínicas	6
1.4.1 Gingivoestomatitis herpética	7
1.4.2 Queratoconjuntivitis herpética	7
1.4.3 Herpes genital	8
1.4.4 Encefalitis herpética	8
1.4. 5 Infección del recién nacido	9
1.5 Patogénesis	10
1.6 Ciclo de Replicación Viral	11
1.7 Tratamiento	17
1.7.1 Aciclovir (ACV)	18
1.7.1.1 Mecanismo de acción del Aciclovir	18
1.7.1.2 Resistencia al Aciclovir	20
1.8 Plantas Medicinales	21
1.9 <i>Jatropha dioica</i>	23
1.10 Rioloatriona	24
1.11 Ensayos preliminares sobre el mecanismo de acción de extractos o compuestos puros aislados de plantas	26

1.12 Justificación	29
1.13 Objetivos	30
1.13.1 Objetivo general	30
1.13.2 Objetivos específicos.....	30
CAPÍTULO 2.....	31
MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
2.1 Material.....	31
2.1.1 Material del laboratorio.....	31
2.1.2 Material biológico.....	32
2.1.3 Equipo.....	32
2.1.4 Reactivos.....	32
2.2 Métodos	34
2.2.1 Cultivo de células.....	34
2.2.2 Obtención del concentrado viral	35
2.2.3 Estandarización del número de células por pozo	35
2.2.4 Determinación del título del concentrado viral a 37°C.....	36
2.2.5 Ensayo actividad virucida.....	37
2.2.6 Ensayo actividad protectora.....	39
2.2.7 Determinación del título del concentrado viral a 4°C.....	40
2.2.8 Ensayo de inhibición de la adherencia	40
2.2.9 Ensayo de inhibición de la entrada	41
2.2.10 Obtención de las proteínas de los diferentes modelos	42
2.2.11 Análisis de proteínas mediante Western Blot	42
2.2.12 Análisis Estadístico	43

CAPÍTULO 3	44
RESULTADOS	44
3.1 Estandarización del número de células por pozo	44
3.2 Determinación del título del concentrado viral a 37°C	44
3.3 Determinación de la actividad virucida	45
3.4 Determinación de la actividad protectora	46
3.5 Determinación del título del concentrado viral a 4°C	49
3.6 Determinación de la inhibición de la adherencia	49
3.7 Determinación de la inhibición de la entrada	50
3.8 Análisis de las proteínas mediante Western Blot	52
CAPÍTULO 4	56
DISCUSIÓN	56
4.1 Estandarización del número de células por pozo	56
4.2 Determinación del título del concentrado viral a 37°C	57
4.3 Determinación de la actividad virucida	58
4.4 Determinación de la actividad protectora	59
4.5 Determinación del título del concentrado viral a 4°C	61
4.6 Determinación de la inhibición de la adherencia	61
4.7 Determinación de la inhibición de la entrada	62
CAPÍTULO 5	65
CONCLUSIONES	65
CAPÍTULO 6	66
PERSPECTIVAS	66
CAPÍTULO 7	67
REFERENCIAS	67

LISTA DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Características principales de los miembros de la familia <i>Herpesviridae</i> de importancia clínica	2
2	Genes y Proteínas expresados por VHS-1	16
3	Fármacos para tratar las infecciones por VHS-1	17
4	Plantas con demostrada actividad antiviral	22
5	UFP contadas en cada tubo utilizado en el ensayo de reducción de placas virales a 37°C	45
6	Determinación de la IC ₅₀	49
7	UFP contadas en cada pozo en el título viral a 4°C	49

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Estructura de la partícula viral del Virus Herpes Simplex	4
2	Adhesión y entrada del VHS-1 a la célula	13
3	Ciclo de replicación del VHS-1	15
4	Estructura del Aciclovir y la guanosina	18
5	Mecanismo de acción del Aciclovir	19
6	Estructura química de Rioloatriona	24
7	Estructuras químicas de los compuestos obtenidos con sus respectivos índices de selectividad	25
8	Ciclo de replicación viral dividido en estadios pre y post-infección	28
9	Tubos utilizados para las diluciones logarítmicas del concentrado viral	36
10	Diluciones del concentrado viral para el ensayo de actividad virucida.	38
11	Western blot de la proteína viral ICP 8. Ensayo Protección 12 h	52
12	Western blot de la proteína viral ICP 0. Ensayo Entrada 1 h	53
13	Western blot de la proteína viral ICP 8. Ensayo Entrada 1 h	54

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Descripción	Página
1	Resultados de las partículas virales puestas en contacto 1 h con Rioloatriona	46
2	Resultados de células pre- tratadas 1 h con Rioloatriona y posterior contacto con las partículas virales	47
3	Resultados de células pre- tratadas 12 h con Rioloatriona y posterior contacto con las partículas virales	48
4	Resultados de células pre- tratadas 24 h con Rioloatriona y posterior contacto con las partículas virales	48
5	Resultados de la evaluación de la inhibición de la adherencia de la partícula viral a la célula	50
6	Resultados de la evaluación de la inhibición de la entrada de la partícula viral a la célula a los 30 min	51
7	Resultados de la evaluación de la inhibición de la entrada de la partícula viral a la célula al tiempo de 1 h.	51
8	Resultados del análisis densitométrico del triplicado del Western Blot de la proteína viral ICP 8 en el ensayo de protección 12 h	53
9	Resultados del análisis densitométrico del Western Blot de la proteína viral ICP 0 en el ensayo de entrada 1 h	54
10	Resultados del análisis densitométrico del triplicado del Western Blot de la proteína viral ICP 8 en el ensayo de entrada 1 h	55

LISTA DE ABREVIACIONES

ACV	Aciclovir
ACV-TP	Aciclovir trifosfato
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
CMV	Citomegalovirus
CC	Control de crecimiento celular
C ⁻	Control negativo de infección
C ⁺	Control positivo
D.E.	Desviación estándar
DENV-2	Virus dengue serotipo 2
FD	Factor de dilución
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
gB	glucoproteína B
gC	glucoproteína C
gD	glucoproteína D
gE	glucoproteína E
gG	glucoproteína G
gH	glucoproteína H
gL	glucoproteína L
gK	glucoproteína K
gL	glucoproteína L
gM	glucoproteína M
H	Horas
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IgG	Inmunoglobulina G
ICP	Proteínas intracelulares virales

Kbp	Pares de kilobases
MEHV	Mediador de entrada de herpesvirus
mL	Mililitros
NEM	Nuevas entidades moleculares
PNNM	Productos naturales no mamíferos
qPCR	PCR en tiempo real
rpm	Revoluciones por Minuto
SNC	Sistema Nervioso Central
TK	Timidina Cinasa
VHC	Virus Hepatitis C
VHH-4	Virus Epstein-Barr
VHH-5	Citomegalovirus
VHH-6	Virus Herpes Humano 6
VHH-7	Virus Herpes Humano 7
VHH-8	Virus Herpes Asociado a Sarcoma de Kaposi
VHS	Virus del Herpes Simplex
VHS-1	Virus del Herpes Simplex tipo 1
VHS-2	Virus del Herpes Simplex tipo 2
VHV-3	Virus Varicela-Zoster
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
µg	Microgramos
% p/p	Porcentaje peso/peso
% p/v	Porcentaje peso/volumen
°C	Grados Celsius

RESUMEN

Q.C.B. Dinora Elizabeth Ferrel Hernández

Fecha de graduación:

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título: ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE RIOLOZATRIONA EN LA VÍA DE INFECCIÓN POR VHS-1

Número de páginas: 71

Candidato para el grado de Maestría en
Ciencias con Orientación en Química
Biomédica

Área de estudio: Química Analítica

Propósito y método del estudio:

La infección por VHS-1 está ampliamente distribuida en todo el mundo. Actualmente, la mayoría de los fármacos utilizados son análogos de la guanosina, los cuales actúan a nivel de la replicación viral siendo el ACV el estándar de oro. Sin embargo, estos agentes no erradican el virus del huésped, además se han reportado casos de resistencia a este antiviral principalmente en pacientes inmunocomprometidos. Por lo que es necesario la búsqueda de nuevos agentes que cuenten con un mecanismo de acción diferente al del ACV, una fuente de dichos compuestos son las plantas medicinales. Rioloatriona es un diterpenoide aislado de *J. dioica*, con demostrada actividad antiherpética *in vitro* e *in vivo*. En el presente trabajo se realizaron estudios preliminares para evaluar el posible mecanismo de acción en diferentes estadios de la infección por VHS-1. Se desarrollaron 4 ensayos (actividad virucida, actividad protectora, inhibición de la adherencia e inhibición de la entrada) con la finalidad de evaluar la actividad de Rioloatriona en las etapas de pre y post-infección por VHS-1. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante la prueba de Dunnett ($p \leq 0.05$) encontrándose diferencia estadísticamente significativa en los ensayos de protección 12 h y de entrada 1 h, a las 3 concentraciones probadas. Dichos ensayos fueron utilizados para obtener y analizar las proteínas virales mediante Western Blot, las cuales están involucradas en las etapas temprana e intermedia del ciclo de replicación viral, con el fin de determinar si estas proteínas están involucrados en el mecanismo de acción antiherpética de Rioloatriona.

Conclusiones y contribuciones:

Se desarrollaron 4 ensayos para evaluar la actividad de Rioloatriona en las etapas tempranas de la vía de infección por VHS-1. Se encontró que Rioloatriona no tiene actividad virucida, sin embargo, ejerce un efecto protector sobre las células cuando estas son tratadas 12 h antes de la infección. Además, no inhibe la adherencia de la partícula viral a la célula, pero presenta un efecto de inhibición en la entrada de la partícula viral a la célula.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



Dr. C. David Arturo Silva Mares

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Herpes

El herpes es una enfermedad causada por los virus herpes simplex 1 (VHS1) y virus herpes simplex 2 (VHS-2) (1). La infección por VHS-1 es altamente contagiosa y tiene una alta prevalencia a nivel mundial (1).

El VHS pertenece a la familia *Herpesviridae*, son virus grandes y envueltos, cuyo material nuclear es ADN. Existen aproximadamente 80 virus herpes que infectan en el reino animal. Se reconocen ocho virus herpes humanos: VHS-1, VHS-2, Virus Varicela-Zoster (VHV-3), Virus Epstein-Barr (VHH-4), Citomegalovirus (VHH-5), Virus Herpes Humano 6 (VHH-6), Virus Herpes Humano 7 (VHH-7) y Virus Herpes Asociado a Sarcoma de Kaposi (VHH-8) (2).

Los herpesvirus se clasifican en tres subfamilias: *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*, sus características principales quedan resumidas en la Tabla 1.

TABLA 1. Características principales de los miembros de la familia *Herpesviridae* de importancia clínica

Nombre	Acrónimo	Sinónimo	Subfamilia y genes	Tamaño del genoma (Kbp*)
HV Humano 1	VHH-1	Virus Herpes Simplex tipo 1	A	152
HV Humano 2	VHH-2	Virus Herpes Simplex tipo 2	A	155
HV Humano 3	VHH-3	Virus Varicela-zoster	A	125
HV Humano 4	VHH-4	Virus Epstein-Barr	Γ	172
HV Humano 5	VHH-5	Citomegalovirus	B	236
HV Humano 6	VHH-6 ^a	HV-6 variante A	B	159/170
HV Humano 6	VHH-6B	HV-6 variante B	B	162/168
HV Humano 7	VHH-7	No aplica	B	145
HV Humano 8	VHH-8	Asociado a Sarcoma de Kaposi's	Γ	170/210

*Kbp.Pares de Kilobases

Todos los virus herpes tienen la característica de causar una infección lítica en células permisivas. Además de establecer una infección latente en células neuronales, estos pertenecen a la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, especialmente en ganglio trigémino. Por otra parte, los *Betaherpesvirinae* infectan glándulas salivales y linfocitos de bazo, mientras que los miembros de la subfamilia *Gammaherpesvirinae* principalmente a los linfocitos B y T (3)(4).

1.1.1 Estructura Viral

El tamaño del VHS oscila entre 150-250 nm, sus principales componentes estructurales son:

1. Núcleo: contiene ADN lineal bicatenario. El núcleo no contiene proteínas altamente básicas, incluidas las histonas, que neutralizarían las cargas negativas en el ADN viral, que permiten un plegamiento adecuado dentro de la cápside; sin embargo, los viriones altamente purificados contienen las poliaminas espermidina y espermina, aproximadamente 70,000 moléculas de espermidina y 40,000 moléculas de espermina por virión. (3)
2. Cápside: Su diámetro aproximado es de 100 nm, formada por 162 capsómeros que forman una estructura deltaicosaédrica. La cubierta externa de la cápside está compuesta de cuatro proteínas virales, VP5 (UL19), VP19C (UL38), VP23 (UL18) y VP26 (UL35). Siendo VP5, la principal proteína de la cápside.

3. Tegumento: es la estructura proteica entre la cápside y la envoltura, se puede distribuir asimétricamente y el espesor puede variar, dependiendo de la ubicación del virión dentro de la célula infectada. Está compuesto por al menos 18 proteínas virales. Las más notables de las proteínas asociadas con el tegumento son la proteína transactivadora VP16 del virión (también conocida como factor α -trans inductor o α -TIF), la proteína del “cancelamiento” celular (*vhs*) y una proteína denominada VP1-2, que desempeña un papel en la liberación de ADN a través del poro nuclear durante la entrada del virus(3).

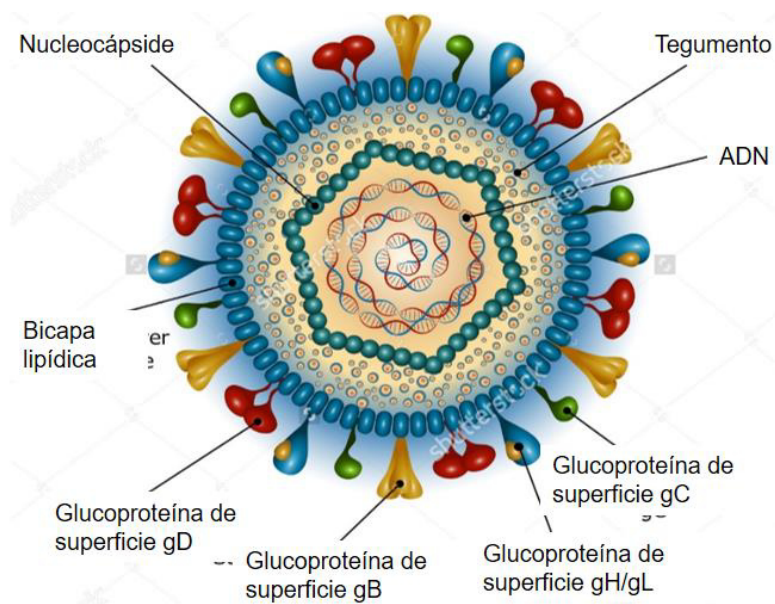


Figura 1. Estructura de la partícula viral del Virus Herpes Simplex

Envoltura: Consiste en una bicapa lipídica con hasta 13 glicoproteínas virales presentes en ella. Las glicoproteínas de la envoltura del virión son gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL y gM. La envoltura del virión también contiene al menos dos proteínas de membrana intrínsecas no glicosiladas (3).

1.2 Epidemiología

En el año del 2012, se estimó que en la población de 0-49 años de edad había 3,708 millones de personas infectadas, lo cual representaba el 67% de la población mundial, siendo África Sudoriental y el Pacífico Occidental donde se presentó una mayor prevalencia con 1,009 millones y 890 millones respectivamente. Además, se estimó que en la población de 15-49 años había 140 millones de personas con infección genital por VHS-1, la mayoría de los cuales se presentaron en América, Europa, parte de Asia y Australia (5).

Oregón y colaboradores en el 2010 publicaron un estudio realizado entre el 2002 y 2005 en la población estudiantil de la Universidad Autónoma de Morelos. Encontraron que, en las 815 muestras de sangre y genitales, la seroprevalencia de IgG contra VHS-1 fue de del 56.7 %; los factores con los cuales se asoció fueron: el intercambio de sexo por dinero, el número de parejas sexuales, así como relaciones con personas del mismo sexo, además de parejas ocasionales, siendo el primero de estos con el que se encontró mayor asociación (6).

1.3 Transmisión del VHS-1

Los mecanismos de transmisión involucrados en la infección por VHS-1 son el contacto directo de piel o mucosas, entre un sujeto que está excretando el virus, en forma sintomática o asintomática y el otro que es susceptible a la infección. El virus es muy lábil, se inactiva muy fácilmente con la desecación, los detergentes y las condiciones imperantes en el tubo digestivo. Las formas más frecuentes de adquirir la infección son por contacto bucal como el beso, la auto inoculación en la mucosa conjuntival, o en la piel a través de micro lesiones o contacto sexual, en algunas ocasiones la madre puede transmitir VHS-1 al hijo en el momento del parto (7).

1.4 Manifestaciones clínicas

El herpes es una enfermedad caracterizada por la aparición de vesículas en mucosa y piel, las cuales son transparentes situadas en una base eritematosa que evolucionan a lesiones pustulosas, serosas, generando úlceras y lesiones costrosas. VHS-1 genera una morbilidad significativa cuando infecta el área facial, principalmente afectando el ojo y/o el cerebro, principalmente en individuos inmunocomprometidos o recién nacidos (8).

1.4.1 Gingivoestomatitis herpética

En países en desarrollo, la población más afectada son niños entre 1 a 3 años, que presentan un cuadro caracterizado por fiebre alta, sialorrea, lesiones vesiculares en la mucosa oral, labios, lengua, encías y paladar duro, que posteriormente se ulceran causando dolor e inapetencia. Este cuadro es autolimitado cesando alrededor de los diez días. La infección recurrente labial se ubica en la unión mucocutánea del labio. Es frecuente que, en la infección activa, preceda a la aparición de vesículas, prurito y ardor localizado. Una vez que las vesículas erupcionan, se transforman en costras al cabo de dos a tres días y desaparecen luego de una semana, perdiendo la infectividad viral (2).

1.4.2 Queratoconjuntivitis herpética

Las infecciones virales del ojo generalmente son causadas por VHS-1 más allá de la edad del recién nacido. La queratoconjuntivitis herpética primaria se asocia con conjuntivitis unilateral o bilateral, que puede ser de naturaleza folicular, seguida poco después por una adenopatía preauricular. La infección del ojo por VHS-1 también se asocia con fotofobia, lagrimeo, edema en párpados y quemosis, acompañada de indicios patognomónicos de lesiones dendríticas ramificadas causando eventualmente, parálisis neurotransmisora postherpética. Con la enfermedad progresiva la infección se asocia en baja frecuencia con una úlcera geográfica de la córnea. La curación de la córnea puede tomar hasta un mes, incluso con la terapia antiviral adecuada, en casos clínicos mal pronosticado se puede desarrollar encefalitis herpética, se explicará posteriormente.

1.4.3 Herpes genital

Esta infección viral, se caracteriza por la aparición de pápulas, vesículas, pústulas, úlceras en la piel y mucosa de los genitales femeninos o masculinos. En los hombres, las lesiones suelen localizarse en el glande o el tallo del pene y ocasionalmente en la uretra. En las mujeres, las lesiones pueden aparecer en la vulva, vagina o cuello uterino, además de la zona perianal o el interior de los muslos, a menudo van acompañadas de prurito y secreción vaginal mucoide. El sexo anal puede producir proctitis por VHS-1, una enfermedad en la que las lesiones se localizan en la zona inferior del recto y el ano. Las lesiones suelen ser dolorosas. En los pacientes de ambos sexos la infección primaria puede ir acompañada de fiebre, malestar, mialgias y adenitis inguinal, que son síntomas relacionados con una viremia transitoria. Cuando la infección ocurre en un huésped que carece de inmunidad contra VHS-1, la sintomatología suele ser más intensa, con manifestaciones clínicas y con una excreción viral más prolongada. Los síntomas más comunes son fiebre, cefalea, dolores musculares y disuria (2)(7).

1.4.4 Encefalitis herpética

Desarrollada comúnmente por VHS-1, esta se manifiesta por lesiones limitadas a uno de los lóbulos temporales. Es uno de los cuadros clínicos más graves e importantes de reconocer y debe ser tratado con antivirales en forma inmediata, con el objeto de mejorar el pronóstico vital, así como evitar complicaciones y secuelas para el paciente. Se manifiesta en niños y adultos, como un cuadro febril y cefalea, alteraciones de la

conciencia, conducta bizarra, convulsiones focales asociadas a rápido deterioro de la conciencia. El compromiso del tejido encefálico es de tipo destructivo, por lo que las secuelas neurológicas son frecuentes entre los que sobreviven (2), además existen casos de reactivación neuronal y efecto postherpético en sujetos de la tercera edad, como se mencionó previamente.

1.4. 5 Infección del recién nacido

Puede ser adquirida en el útero, aunque con mayor frecuencia se contrae durante el paso del feto a través del canal del parto. Es una afección rara, con una frecuencia estimada de 10 casos por 100,000 nacidos, pero puede producir discapacidad neurológica persistente, e incluso la muerte. El riesgo de herpes neonatal es mayor cuando la madre ha contraído la primera infección al final del embarazo. Las mujeres con herpes genital antes del embarazo tienen un riesgo mucho menor de transmitir el virus a sus hijos (5).

Inicialmente el recién nacido presenta septicemia y puede mostrar, o no, lesiones vesiculares. Puesto que en el todavía no se ha desarrollado la respuesta inmunitaria celular, el VHS-1 se extiende hasta el hígado, el pulmón y otros órganos, así como hasta el sistema nervioso central (SNC). La evolución de la infección hasta la afectación del SNC provocando retraso mental o incapacidad neurológica incluso la muerte, a pesar del tratamiento (7).

1.4.6 Panadizo herpético

El panadizo herpético es una infección de los dedos. El virus inicia la infección a través de cortes o abrasiones en la piel. El panadizo herpético aparece a menudo en las enfermeras o médicos que atienden a pacientes con infecciones por VHS-1, en niños que se chupan el dedo y en individuos que presentan infecciones genitales por VHS-1 (7).

1.5 Patogénesis

La partícula viral infecta células mucoepiteliales y se replica en ellas, produce daño celular en el lugar de la infección y posteriormente establece una infección latente en las células neuronales que las inervan. El virus puede reactivarse desde la latencia por diversos factores como el estrés, cambios térmicos, emocionales o la supresión inmunitaria. La inmunidad mediada por células es necesaria para la curación, además el papel de los anticuerpos neutralizantes es limitado. Los efectos inmunofisiopatológicos mediados por células contribuyen a la aparición de los síntomas.

Generalmente, la inhibición de la síntesis macromolecular celular que induce el virus provoca: la lisis celular, la degradación del ADN de la célula huésped, permeabilidad de la membrana, destrucción del citoesqueleto y la senescencia de la célula. Además, se producen cambios visibles en la estructura nuclear, marginación de la cromatina y se forman cuerpos de inclusión intranucleares acidófilos de Cowdry de tipo A.

En los cultivos tisulares, el VHS-1 destruye rápidamente las células, haciendo que adopten una morfología redondeada. La infección viral se inicia a través de las membranas mucosas o de lesiones en la piel. El virus se replica en las células presentes en la base de la lesión, e infecta la neurona que inerva esa zona, desplazándose por transporte retrógrado mediante la asociación con moléculas de dineína hasta el ganglio trigémino como transcripto viral (2).

Los linfocitos T CD8⁺ y el interferón (IFN), son importantes para mantener el VHS-1 latente. Después el virus volverá al punto inicial de infección, migrando en forma inaparente e inducir lesiones vesiculares, estas contienen un líquido vesicular rico en viriones altamente infecciosos, manteniendo una infección activa. Generalmente la lesión se cura sin producir ninguna cicatriz (7).

1.6 Ciclo de Replicación Viral

- Adherencia y entrada

La entrada de VHS-1 en las células, implica la interacción de al menos cinco glucoproteínas de la envoltura del virión, con varias moléculas receptores en la superficie de la célula y se da como consecuencia de la fusión de la envoltura, con una membrana celular, es decir una endocitosis mediada por receptor. La interacción inicial del VHS-1 con la superficie celular, generalmente se da mediante heparán sulfato (9). Esta unión puede estar mediada por la glicoproteína gB o gC de la envoltura, lo cual sirve para

concentrar el virus en la superficie celular y mejora significativamente la eficacia de la entrada del virus (10). Los siguientes pasos involucrados en la entrada del virus, consisten en la interacción de gD con sus receptores, además de la fusión entre la envoltura y la membrana celular mediante el heterodímero gH/gL y gB. La proteína gD interactúa con uno de los tres receptores naturales. Estos incluyen nectina-1 y -2, mediador de entrada de herpesvirus (MEHV) y una forma seleccionada de heparán sulfato 3-O sulfatado (3-O HS) (11). Las nectinas son moléculas de adhesión intercelular expresadas en células epiteliales y neuronales, son miembros de la familia de Ig's extendida. Los dominios *N*-terminales de un dímero de nectina en la superficie de una célula, forman dímeros *trans* con los dominios correspondientes de nectinas en células adyacentes. Los dominios C-terminales incrustados en el citoplasma interactúan con afadin, que a su vez ancla las nectinas al citoesqueleto. Estudios anteriores demostraron que gD de VHS-1 interactúa con el dominio amino-terminal V1 de nectina-1 (3).

La conformación de gD se altera de manera específica por su interacción con cualquiera de sus receptores. La consecuencia del cambio conformacional son los cambios en gH así como en gL, seguido de la activación de gB, que es lo que permite la fusión de la envoltura con la membrana celular (ver Figura 2) (8).

Una vez que se lleva a cabo la fusión de las membranas, se liberan en el citoplasma diferentes proteínas que están presentes en el tegumento y cápside viral.

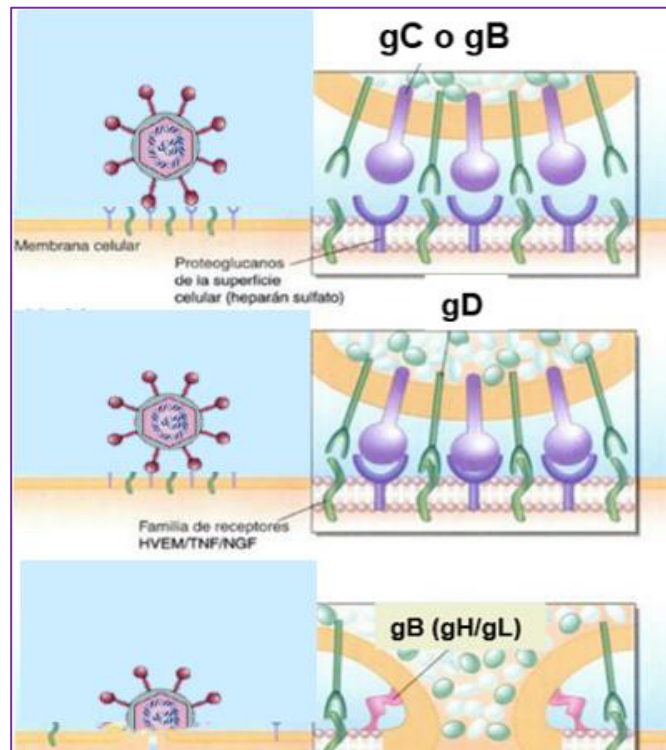


Figura 2. Adhesión y entrada de VHS-1 a la célula

- Replicación

El tegumento contiene algunas proteínas necesarias para que se lleve a cabo el arresto celular, a medida que la partícula viral se desnuda, algunas de las proteínas del tegumento permanecen en el citoplasma (ejemplo la proteína del “cancelamiento” celular, virus host shutoff, *vhs*), mientras que otras proteínas como VP16 se transportan al núcleo. *Vhs* es capaz de degradar todos los tipos de ARN, pero sólo destruye el ARNm en células infectadas, lo cual trae como consecuencia la represión o la regulación negativa de la síntesis de las proteínas de la célula huésped, ocasionando la acumulación en el citoplasma de los ARNm virales y la traducción de manera preferente. El ARNm viral estará

estabilizado por *vhs* a través de la estabilización del complejo gE/gI que es necesaria para la propagación célula a célula. Además, *vhs* reduce la síntesis de proteínas de la respuesta inmune innata y adaptativa, por lo tanto, bloquea el sistema de interferón tipo I, las células dendríticas, reduce la producción de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas (4).

Una vez que VP16 se une al ADN se inicia la transcripción en cascada secuencial mediante la expresión de los genes α (inmediatos-tempranos), luego los β (tempranos) y al final los γ (tardíos) (ver Figura 3). Los genes inmediatos-tempranos (IE), sus picos de síntesis son de 2-4 h postinfección, los cuales sirven como transactivadores de la expresión de los genes tempranos (E). Estos se detectan fácilmente a las 4 horas postinfección, pero alcanzan las tasas más altas de acumulación entre 6 y 12 horas postinfección. La síntesis de ADN viral puede detectarse 3 horas después de la infección y continúa durante al menos 10 a 12 horas más. Las proteínas de los genes tempranos incluyen a las enzimas que se requieren para la replicación del genoma viral: ADN polimerasa y factores virales de transcripción adicionales. Finalmente, la expresión de genes virales termina con la aparición de las proteínas gamma o tardías, que constituyen a las proteínas estructurales del virus. Las proteínas virales se traducen en el citoplasma, el ADN viral se replica y se empaqueta en cápsides en el núcleo (3).

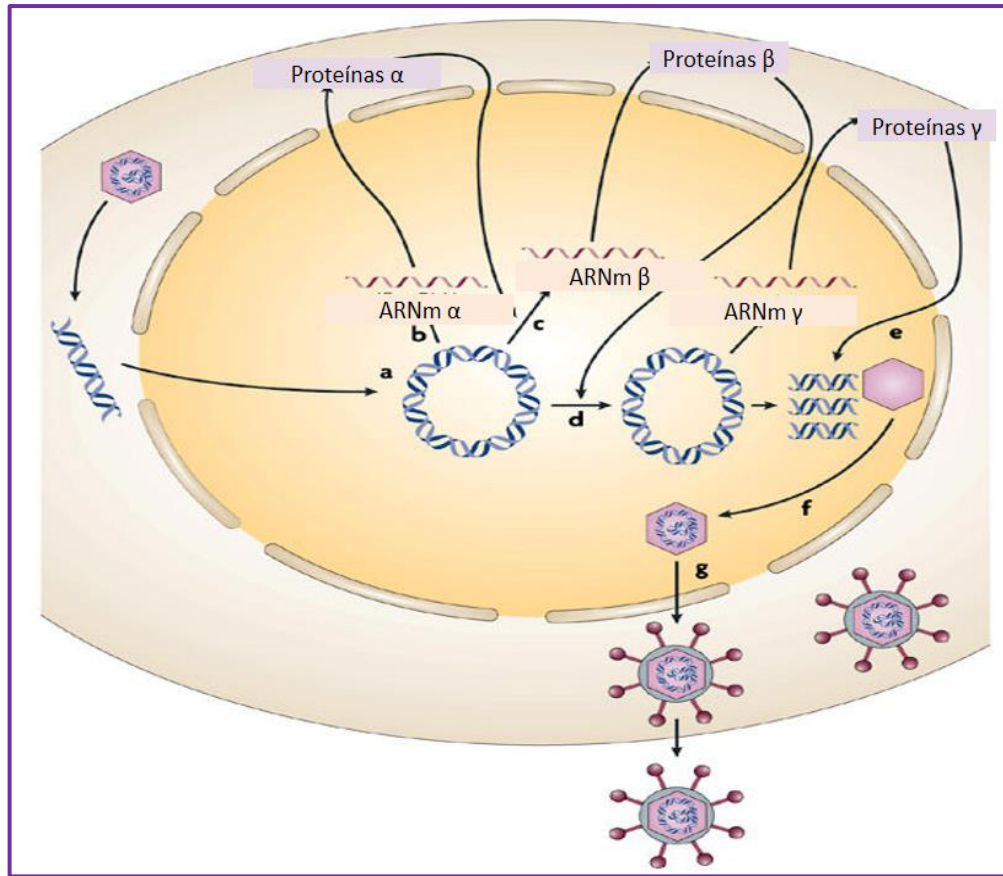


Figura 3. Ciclo de replicación del VHS-1

TABLA 2. Genes y Proteínas expresados por VHS-1

Genes	Proteína	Función
Inmediatos-Tempranos	ICP 0	Se expresa durante la infección celular, trans-activadora promiscua de los genes α , β y γ ; inhibe la expresión de IRF-3; necesaria para la reactivación.
	ICP 4	Inhibe la expresión de transcriptos LATs y L/STs en las infecciones productivas.
	ICP 22	Multifuncional; necesaria para la replicación viral, modifica la RNA polimerasa II celular.
	ICP 27	Promueve la transición entre la expresión de RNA de genes α hacia los β y γ . Inhibe la apoptosis en el proceso de establecimiento de latencia.
	ICP 47	Inhibe la presentación antigénica por MHC-I al inhibir las proteínas de transporte celular TAP-1 y TAP-2, lo que impide el transporte de péptidos virales al retículo endoplásmico.
Tempranos	ICP 8	Se une preferentemente al ADN monocatenario, y esta función es esencial para la replicación del ADN vírico. También exhibe una actividad desestabilizadora de hélice, pero puede catalizar la renaturalización de cadenas simples complementarias.
Tardíos	VP5	Principal proteína de la cápside.
	VP21	Puede servir como andamio para el ensamblaje de la cápside.
	VP24	Puede ser una proteína asociada a la cápside porque desempeña un papel en la encapsidación del ADN

1.7 Tratamiento

Actualmente existen diferentes fármacos para tratar las infecciones inducidas por el VHS-1 (ver Tabla 3). El tratamiento depende del tipo y localización de la infección, así como del estado inmunitario del paciente. Es importante mencionar que el tratamiento solo trata los signos y síntomas, pero no cura la enfermedad. El aciclovir (ACV) y su profármaco valaciclovir, así como el profármaco de penciclovir, famciclovir, son los tratamientos más útiles y ampliamente utilizados para el tratamiento de infecciones por VHS-1. Estos fármacos actúan inhibiendo la replicación viral a nivel de la timidina cinasa (tk)(3) (8).

TABLA 3. Fármacos para tratar las infecciones por VHS-1

Fármacos Antivirales aprobados por la FDA	Grupo químico activo antiviral	Agente viral
Aciclovir	Análogo de guanosina	VHS-1, VHS-2, VZV
Famciclovir	Análogo de guanosina	VHS-1, VHS-2, VZV
Penciclovir	Análogo de guanosina	VHS-1 y VHS-2
Valaciclovir	Análogo de guanosina	VHS-1, VHS-2 y VZV
Foscarnet	Análogo del pirofosfato	CMV, VHS-1 y VHS-2
Cidofovir	Análogo de la citosina	VHS-1, VHS-2, CMV

1.7.1 Aciclovir (ACV)

El ACV está estrechamente relacionado con el componente natural del ADN, la guanina desoxirribosa, pero carece de los carbonos 2' y 3' y del grupo 3'-hidroxilo del anillo de desoxirribosa, lo que provoca una apertura del ciclo (ver Figura 4). La ausencia de átomos de carbono en las posiciones 2' y 3' provoca que sea incapaz de participar efectivamente en la síntesis de ADN (12).

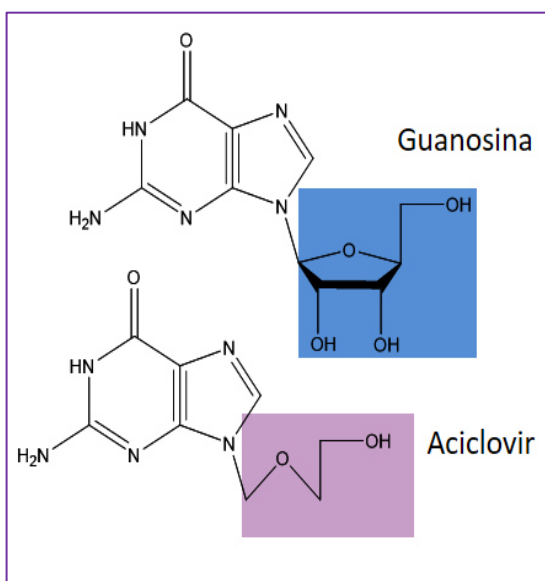


Figura 4. Estructura del Aciclovir y la guanosina

1.7.1.1 Mecanismo de acción del Aciclovir

El Aciclovir se convierte a ACV-fosfato por la actividad de una enzima timidina cinasa producida por el virus herpes (VHS-TK), posteriormente por enzimas celulares es convertido a Aciclovir trifosfato (ACV-TP), el cual compite con la guanosina-trifosfato

por incorporarse al ADN. Finalmente, el ACV-TP actúa como un sustrato y se incorpora a la cadena de ADN en crecimiento frente a un residuo de citosina (ver Figura 5), para que la polimerasa se transloque a la siguiente posición en la plantilla y no pueda agregar un nuevo desoxirribonucleótido trifosfato. Esto se debe a que el ACV no contiene un grupo 3'-hidroxilo, siendo el ACV-TP un terminador obligado de la cadena de ADN (3). Además, la incorporación del ACV-TP inhibe la ADN polimerasa de los virus herpes, pero no a la polimerasa de la célula huésped (12).

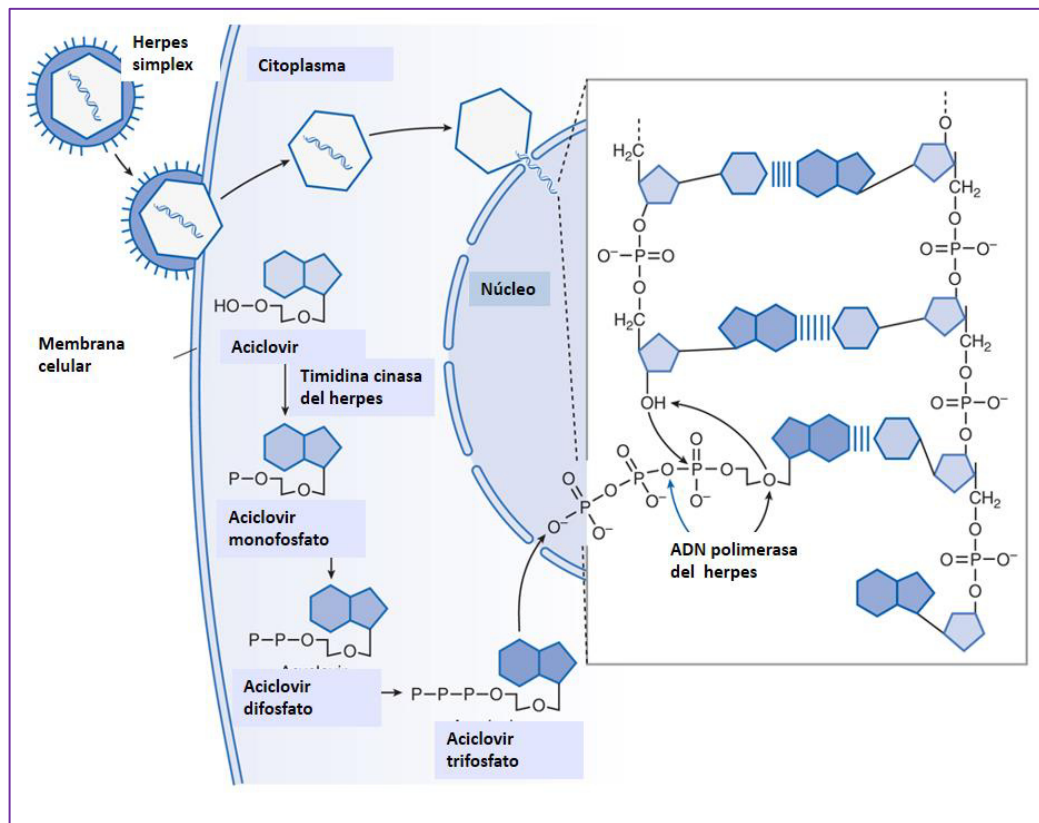


Figura 5. Mecanismo de acción del Aciclovir

1.7.1.2 Resistencia al Aciclovir

El mecanismo de resistencia a los antivirales es debido a la reducción o eliminación del VHS-TK, esta enzima es responsable del primer paso en la activación de Aciclovir, además de una mutación en el gen que codifica el ADN polimerasa viral, por lo que el ADN polimerasa viral mutada ya no es sensible al ACV-TP. Clínicamente, la primera es la forma de resistencia que ocurre con mayor frecuencia y pueden ser las siguientes:

1. Deficiencia de la TK en el virus.
2. TK alterada. Mutación específica en el gen TK que reconoce poco el Aciclovir, pero puede fosforilar los nucleósidos naturales requeridos por el virus para la replicación.
3. Mutación en el ADN polimerasa codificada por el virus de manera que no reconocerá fácilmente el Aciclovir-TP, pero aún reconocerá los trifosfatos de los sustratos naturales con la suficiente eficacia como para permitir la rápida replicación del virus.

Sin embargo, dichas mutaciones no son un problema clínico en pacientes inmunocompetentes, ya que la infección se resuelve fácilmente mediante la respuesta inmune antes de que pueda volverse clínicamente aparente; la prevalencia de infección VHS-1 resistente, en dichos pacientes es baja (0.3-0.7%) (12) (13).

Por otro lado, en pacientes inmunocomprometidos sometidos a un tratamiento prolongado, la prevalencia de infección VHS-1 resistente varía entre 2.5% y 25% dependiendo de la enfermedad subyacente (por ejemplo, trasplante de células madre hematopoyéticas o de órganos sólidos, así como pacientes con VIH/SIDA). Los pacientes

inmunocomprometidos experimentan episodios más frecuentes de reactivación, duración prolongada de los síntomas, aumento de la gravedad de la infección, lesiones más extensas, lesiones atípicas y un mayor potencial de diseminación que puede llegar a ser potencialmente mortal (14).

Como se mencionó anteriormente, algunos fármacos tienen el mismo mecanismo de acción que el ACV, debido a esto no tienen actividad contra cepas ACV resistentes, por lo que es necesario la búsqueda de nuevos agentes anti herpéticos que cuenten con un mecanismo de acción diferente que el del ACV.

1.8 Plantas Medicinales

Las plantas medicinales son un elemento importante de la medicina tradicional en México, y muchas son consideradas como parte del patrimonio cultural de los tiempos prehispánicos y coloniales (15); han sido utilizadas como alternativa a lo largo de los años por muchas culturas para tratar diferentes enfermedades. Las poblaciones indígenas del mundo han generado diferentes tradiciones culturales, a través de comunicación oral y conocimiento empírico, han adquirido conocimiento detallado sobre el uso de las plantas medicinales, los cuales han sido transmitidos de generación en generación (16).

Las plantas son productoras de metabolitos secundarios característicos de un rango limitado de especies, estos son moléculas pequeñas producidas por un organismo que no

son estrictamente necesarios para la supervivencia de este, sino que son producidos a causa de la limitación de nutrientes o como reguladoras del mecanismo de defensa (17).

Una evaluación de todas las nuevas entidades moleculares aprobados por la FDA demostró que los productos naturales y sus derivados representan más de un tercio de éstas. Además, el estudio reveló con respecto a las fuentes de productos naturales que aproximadamente la mitad (44%) provenía de mamíferos (productos bioquímicos naturales), y que las principales especies de origen eran bovinos, porcinos, equinos, caninos y humanos. Las fuentes restantes de productos naturales no mamíferos (PNNM) estaban dominadas por plantas (25% en general, 45% de PNNM), bacterias (16% en general, 29% de PNNM) y hongos (12% en general, 22% de PNNM). La primera nueva entidad molecular (NEM) obtenida a partir de una planta fue la morfina, aprobada en 1827, antes de la creación de la FDA moderna en 1938 (18). A las plantas se les han atribuido diferentes actividades como la antioxidante, antibacterial, antifúngica y contra diferentes virus (ver Tabla 4).

TABLA 4. Plantas con demostrada actividad antiviral

Planta	Virus
<i>Cissampelos pariera</i> Linn	Dengue
<i>Tanacetum vulgare</i>	Herpes Simplex
<i>Agaricus brasiliensis</i>	
<i>Jatropha dioica</i>	
<i>Embelia schimperi</i>	Hepatitis C
<i>Acacia nilótica</i>	
<i>Lepidium meyenii</i>	Influenza

1.9 *Jatropha dioica*

Jatropha dioica es una planta que pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, es nativa de México, presente en los estados Nuevo León, Chihuahua, Coahuila, San Luis Potosí, Estado de México, Hidalgo y Guanajuato, es un arbusto de flores pequeñas que mide de 0.50 m – 1.50 m de altura, sus ramas son de color rojizo. Es conocida como “Sangre de drago” o “Sangre de grado” ya que produce un látex característico color amarillo, que al estar en contacto con el aire se oxida y su color cambia a rojo. Ha sido utilizada para tratar diferentes infecciones como lo son bacterianas, micóticas, virales, periodontitis, así como el salpullido y alopecia. Además, se han evaluado sus propiedades anticancerígenas, antisépticas y antiinflamatorias (19).

En el 2014 Martínez y colaboradores, determinaron la actividad antioxidante de un extracto acuoso y uno metanólico obtenidos a partir de la raíz de *J.dioica* (20), por otro lado Silva-Belmares y cols. en el 2014 determinaron la actividad antimicrobiana contra, *Staphylococcus aureus* , *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* y *Escherichia coli* (21).

En el 2012 Silva Mares y cols., demostraron la actividad *in vitro* contra VHS-1 y VHS-2 de un extracto hidroalcohólico obtenido a partir de la raíz de la planta. Además, obtuvieron mediante aislamiento biodirigido un compuesto denominado Riolozatriona, al cual se le determinó su actividad contra VHS-1 y VHS-2 en células Vero, y se demostró que tiene actividad anti-herpética moderada *in vitro* al tener un índice de selectividad de 5.8 (22).

Por último, López Guerrero en su Tesis de Maestría evaluó la actividad del extracto hidroalcohólico contra virus de ARN, como lo son el virus del Dengue y el virus de la Hepatitis C. Se demostró que el extracto utilizado para tratar células Vero infectadas con DENV-2 inhibía un 80 % de la expresión de ARN viral; además realizó un ensayo para tratar células Huh-7 infectadas con VHC, sin embargo, en este caso no hubo una disminución de la expresión de ARN viral (23).

1.10 Riolozatriona

Es un diterpenoide de estructura única (ver Figura 6). Fue aislada por primera vez por Domínguez y cols. en 1980 a partir de la raíz de *Jatropha dioica* (24).

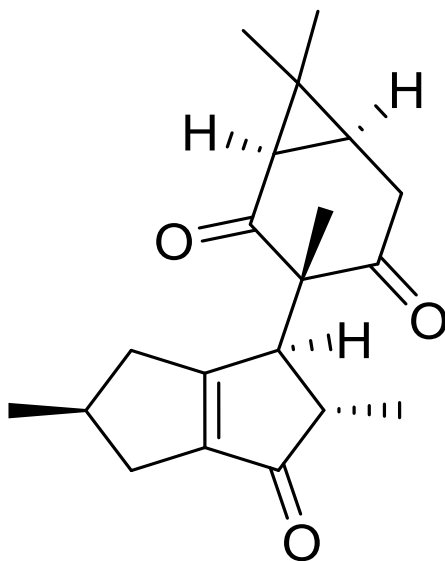


Figura 6. Estructura química de Riolozatriona

Se han realizado diversos trabajos que involucraron a Rioloatriona. En la tesis doctoral de Melchor Martínez se estudió la ruta biosintética de Rioloatriona, lo que fue considerado necesario ya que se trataba de un diterpenoide de estructura única al poseer un esqueleto de tipo Riolozano, por lo que no se contaba con información acerca de su origen biosintético (25).

Estrada Chavarría en su tesis de maestría, realizó estudios de la relación estructura-actividad mediante la síntesis de derivados, lo cual fue realizado debido a la nula información sobre las propiedades químicas de Rioloatriona. Después de haber realizado las modificaciones estructurales, ella obtuvo dos compuestos denominados 1 y 3 (ver figura 7), con un índice de selectividad de 10.9 y 7.3 respectivamente, los cuales son más activos en comparación con el índice de selectividad que Rioloatriona (26).

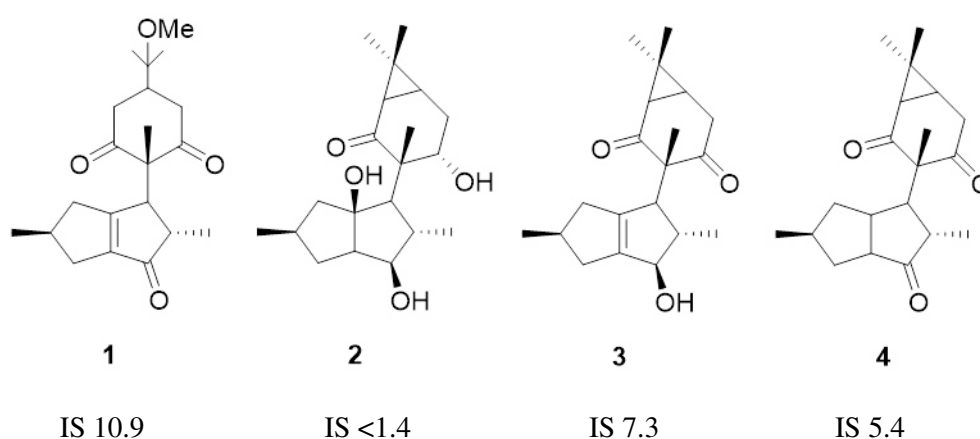


Figura 7. Estructuras químicas de los compuestos obtenidos con sus respectivos índices de selectividad

Tamez Fernández en su tesis de maestría utilizó Rioloatriona para desarrollar dos formulaciones; una solución y un ungüento oftálmico, siendo este último el que mejor resultados mostró. Ratones con queratoconjuntivitis herpética fueron tratados con el ungüento oftálmico (0.3 % p/p), aciclovir (2.5 % p/v) fue usado como control positivo de tratamiento, los resultados obtenidos demostraron que ambos tratamientos mostraron una resolución similar de la enfermedad (27).

Si bien ya se han realizado diferentes trabajos que han involucrado a Rioloatriona como objeto de estudio, aún se desconoce el mecanismo por el cual ejerce su actividad contra VHS-1 y VHS-2 tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo que es necesario realizar estudios que nos den un indicio del mecanismo de acción antiherpética.

1.11 Ensayos preliminares sobre el mecanismo de acción de extractos o compuestos puros aislados de plantas

Se han reportado diferentes artículos científicos, en los cuales mediante el uso de ensayos *in vitro* se detuvo la vía de infección del VHS-1 en diferentes estadios, esto con la finalidad de identificar en cual es en el que muestra la actividad antiviral de diferentes extractos o compuestos puros aislados de plantas.

Álvarez y cols. en el 2011 evaluaron la actividad virucida de 6 extractos y 3 compuestos puros aislados de una planta denominada *Tanacetum vulgare*; En este ensayo se evaluó si el compuesto o extracto utilizado tenían la capacidad de inactivar al virus, antes de que

entrara en contacto con la célula, por lo que primero el virus fue puesto en contacto con el extracto o compuesto a evaluar por media hora a 4°C y posteriormente las células fueron infectadas con la solución de las partículas virales más el extracto o compuesto (28). Nocchi y cols. en el 2016, evaluaron si un extracto crudo hidroalcohólico obtenido de la planta *Schinus terebinthifolia*, protegía a las células de ser infectadas por el virus, por lo que en un primer paso las células fueron tratadas con el extracto en diferentes tiempos y después fueron infectadas con las partículas virales (29).

Gescher y cols. en el 2010, emplearon un ensayo *in vitro* para evaluar si un extracto acuoso obtenido a partir de la planta *Rhododendron ferrugineum* L. era capaz de evitar que el virus se adhiriera a la célula, evitando así la infección viral. Para poder detener la vía de infección en el estadio de adhesión fue necesario que las partículas virales y las células estuvieran a 4°C, ya que a esta temperatura el virus solamente se adhirió a la célula, pero no entro a esta. Luego las células fueron tratadas al mismo tiempo con el virus y el extracto, se dejó una hora en incubación a 4°C para permitir solamente la adherencia de las partículas virales, posteriormente se realizaron lavados para eliminar las partículas virales no adheridas y se aumentó la temperatura de incubación a 37°C para permitir que la vía de infección continuara (30).

Nocchi y cols. en el 2016, evaluaron la actividad de un extracto crudo para evitar que el virus entrara a la célula. De igual forma que el ensayo anterior la temperatura de trabajo fue de 4°C por las razones antes mencionadas. Las células fueron infectadas para luego ser incubadas por una hora a 4°C para permitir la adherencia de las partículas virales, se hicieron lavados para eliminar las partículas virales no adheridas, luego se añadió el

extracto crudo e inmediatamente se aumentó la temperatura de incubación a 37°C, esto a diferentes tiempos, permitiendo así que la vía de infección continuara. Luego de transcurrido el tiempo, se añadió buffer de citratos para inactivar a las partículas virales que no entraron a la célula (29).

Los ensayos antes mencionados demostraron ser útiles para de identificar el estadio en la vía de infección viral, en el que se presenta la actividad antiviral de compuestos puros o extractos analizados.

En este trabajo se evaluaron los estadios de pre-infección (actividad virucida, protectora y adherencia) y el primer paso en la post-infección que involucra la entrada de la partícula viral a la célula (ver figura 8).

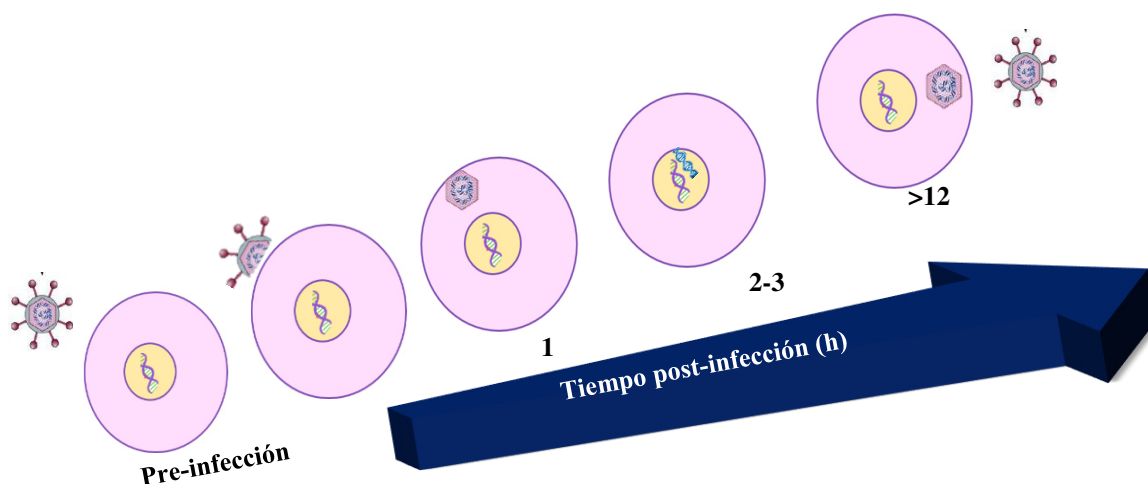


Figura 8. Ciclo de replicación viral dividido en estadios pre y post-infección

1.12 Justificación

El aumento en la identificación de serotipos virales de Herpes Simplex resistentes al ACV, denota la necesidad de nuevos agentes antiherpéticos, que cuenten con mecanismos de acción diferentes al ACV.

Riolozatriona es un diterpenoide aislado de *J. dioica*, con demostrada actividad antiherpética *in vitro* e *in vivo*.

Por lo que es importante realizar estudios preliminares sobre el mecanismo de acción, dirigidos a identificar el estadio en la vía de infección en el que Riolozatriona tiene actividad contra VHS-1, mediante un modelo de infección *in vitro*.

1.13 Objetivos

1.13.1 Objetivo general

Identificar el estadio en la vía de infección en el que Rioloatriona tiene actividad contra VHS-1, mediante un modelo de infección *in vitro*

1.13.2 Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones adecuadas para el desarrollo de los diferentes ensayos del modelo de infección *in vitro*
2. Evaluar el efecto *in vitro* de Rioloatriona en la:
 - a) Actividad virucida
 - b) Protección de células Vero
 - c) Inhibición de la adherencia del VHS-1 en células Vero
 - d) Inhibición de la entrada del VHS-1 a las células Vero
3. Analizar las proteínas involucradas en los estadios de la infección viral.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Material del laboratorio

- Acrodiscos PVDF 45 mm de diámetro con filtro de 0.22 μm Millipore®
- Botellas de 25, 75 y 175 cm^2 forma inclinada con tapón de rosca NEST®
- Crioviales de 2 mL Nalgene®
- Jeringas 3 y 5 mL BD-Plastipak®
- Microplacas estériles de poliestireno de 24 pozos de fondo plano Costar®
- Peines de 1.5 mm de 15 pozos Biorad®
- Pipetas automáticas Accumax Pro® y Eppendorf® de 1, 10, 200 y 1000 μL
- Pipetas serológicas desechables 1, 2, 5, 10 y 50 mL Costar®
- Puntillas 10, 100 μL , 200 μL y 1000 μL , estériles con filtro
- Tubos cónicos 15 y 50 mL Corning®
- Tubos de ensaye 16 X 150 mm
- Tubos eppendorf de 2 y 5 mL

- Scraper Corning®
- Vidrios de 1.5 mm Biorad ®

2.1.2 Material biológico

- Las células Vero, son obtenidas a partir de las células epiteliales del riñón de mono verde africano (*Chlorocebus sabaues*), ATCC ® CCL-81™
- VHS-1 cepa KOS (ATCC ® VR-1493D™

2.1.3 Equipo

- Agitador vórtex Maxi mix II Thermo Scientific®
- Baño de agua Precisión GP O₂ Thermo Scientific®
- Campana de flujo laminar clase 2 con filtro HEPA CSB 120 Prendo®
- Centrifuga con refrigeración Thermo Centra CL3R IEC®
- Incubadora con CO₂ MIDI 40 Thermo Scientific®
- Microscopio invertido CKX41 Olympus®
- Pipetor S1 Pipet filler Thermo Scientific®

2.1.4 Reactivos

- Acrilamida Sigma Aldrich®
- Advanced-DMEM (Medio Eagles Modificación De Dulbecco) Gibco®

- Agua bidestilada
- Agua Mili Q
- Anticuerpo de ratón anti-ICP 8 Abcam® ab20194
- Anticuerpo de ratón anti-ICP 0 Abcam® ab6513
- Anticuerpo de conejo anti-GADPH Abcam ® ab181602
- Anticuerpo secundario anti-ratón Abcam® ab193651
- Anticuerpo secundario anti-conejo Santa Cruz Biotechnology®
- Azul de Bromofenol Biorad®
- Azul tripano Sigma Aldrich®
- Bis-acrilamida Invitrogen®
- Amortiguador Fosfato Salino (PBS) Sigma Aldrich®
- Cloruro de sodio Sigma Aldrich®
- Colorante de Giemsa CTR®
- Dimetil sulfóxido (DMSO) Sigma Aldrich®
- Dodecilsulfato sódico Biorad®
- Dodecilsulfato sódico SDS Affymetrix ®
- EDTA Biorad®
- Etanol grado reactivo, CTR®
- Glicerol Biorad®
- Glicina Biorad®
- Glucosa PiSA ®
- Inhibidor de proteasas Roche®
- Inhibidor de fosfatasas Roche®

- Inmunoglobulina Humana Normal (IgG) Flebogamma® IV
- Kit de Revelado por Quimioluminiscencia Thermo Scientific ® 32209
- Marcador de peso molecular Thermo Scientific®
- Persulfato de amonio Biorad®
- Suero Bovino Fetal Gibco® 1955182
- TEMED Biorad®
- Tripsina-EDTA 0.25% Gibco® 1961601
- Tris-HCl Sigma Aldrich®
- Tritón X-100 Sigma Aldrich®
- Trizma base Sigma Aldrich®
- β -mercaptoetanol Biorad®

2.2 Métodos

2.2.1 Cultivo de células

Células Vero fueron cultivadas en monocapa a una confluencia 80-90% a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂ en frascos T-175 y luego sembradas en placas de 24 pozos. Las células fueron cultivadas en medio advanced-DMEM suplementado con suero fetal bovino al 2%, glutamina, aminoácidos esenciales, estreptomycin y penicilina al 1%.

2.2.2 Obtención del concentrado viral

Una vez que se tuvieron 4 frascos T-175 con células Vero al 90% de confluencia, se descongelaron a 4°C 4 viales correspondiente a la cepa VHS-1 KOS, se les realizó una dilución 1:10 en PBS glucosado al 0.1%, a los frascos se les eliminó el medio y se les añadió la solución preparada del virus, se incubó por 1 hora a 37°C a 60 rpm, se eliminó la solución viral, se añadieron 10 mL de advanced-DMEM y se incubó por 72 horas a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂. Se añadieron 10 mL de medio a cada frasco. El medio de los frascos se trasvasó a tubos cónicos de 50 mL, centrifugados a 4°C por 10 minutos a 1000 rpm, los tubos cónicos se colocaron en hielo y del medio que contenía el virus se tomaron alícuotas de 1 mL y se trasvasaron a crioviales de 2 mL que también fueron colocados en hielo hasta su almacenamiento a -80°C.

2.2.3 Estandarización del número de células por pozo

Las células fueron sembradas en las siguientes cantidades de células en una placa de 24 pozos: 25,000, 50,000, 100,000, 150,000 y 200,000 células, se incubaron a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂, después de 24 horas cada pozo fue observado en el microscopio invertido, se seleccionó la cantidad adecuada de células para tener una capa entre 90-95 % confluyente en cada pozo. Este ensayo se llevó a cabo por triplicado.

2.2.4 Determinación del título del concentrado viral a 37°C

El título viral (concentración de UFP/mL) se realizó mediante diluciones seriadas Log₁₀ de VHS-1 KOS. En una serie de tubos se adicionaron 4.5 mL de PBS glucosado al 0.1% a 5 tubos 16 x 150 mm con tapón de aluminio, se introdujeron en hielo, se enumeraron los tubos del 1 al 5, se tomó 0.5 mL de la solución del concentrado viral de VHS-1 y se depositó en el tubo # 1, se agitó y a partir de este tubo se hicieron diluciones logarítmicas (1:10) hasta el tubo # 6 como se muestra en la figura 9. A cada tubo le correspondió un factor de dilución como se muestra en la tabla 5. Se sembraron 100,000 células Vero por pocillo en 1 placa de 24 pozos, después de 24 h, fueron infectadas con 0.1 mL de cada tubo marcado en su pozo correspondiente y se incubó durante 1 h, a 37 °C en agitación constante. A continuación, se desechó el sobrenadante y se agregó advanced-DMEM suplementado con 0.32% de IgG. Las células se incubaron 72 h. Se utilizó control de crecimiento celular (CC). Por último, las células en los pozos se fijaron con 1 mL de metanol y se tiñeron con 1 mL de Giemsa. Se realizó conteo de placas formadas y se determina en cuál de los pozos se obtiene la aproximadamente de 25 UFP (“tubo título” ó “pozo título”). Se determinó la concentración de UFP/mL mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{UFP \text{ contadas en el pozo título}}{FD \text{ del tubo título}} * Vol. de infección * 10$$
$$= \text{Concentración de UFP/mL}$$

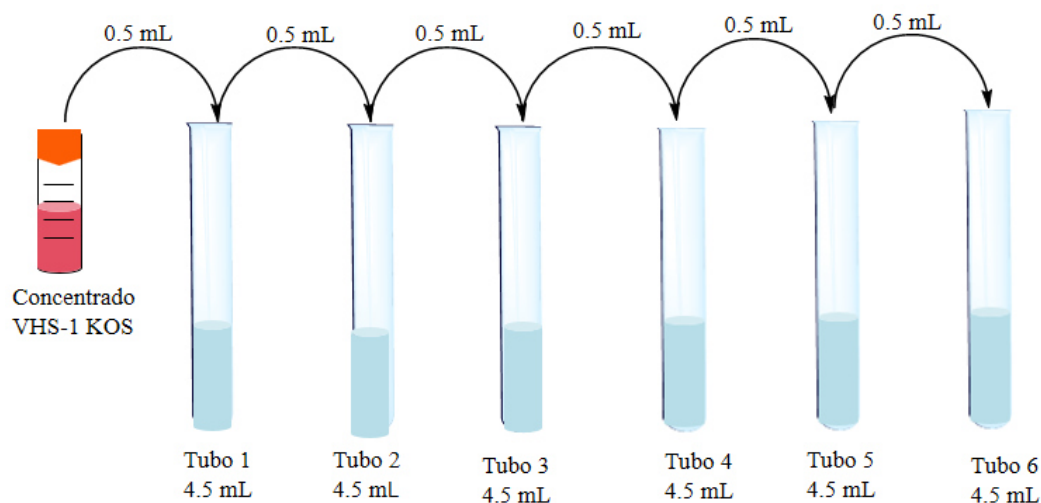


Figura 9. Tubos utilizados para las diluciones logarítmicas del concentrado viral

El volumen necesario del “tubo título” para obtener 25 UFP de VHS-1 respectivamente, fue calculado mediante proporcionalidad con la siguiente fórmula:

$$\frac{25 \text{ UFP} \times \text{volumen de infección en mL}}{\text{No. de UFP contadas}} = \text{mL necesarios del "tubo título"}$$

2.2.5 Ensayo actividad virucida

A un tubo de 16 x 150 mm con tapón de aluminio se adicionaron 4.5 mL y a un segundo 17.898 mL de PBS glucosado al 0.1% y se introdujeron en hielo, se enumeraron los tubos del 1 al 2. Se tomó 0.5 mL de la solución de concentrado viral de VHS-1 y se depositó en el tubo # 1, se agitó y a partir de este tubo se hizo una dilución 1:10, de dicha dilución se tomaron 0.102 mL y se agregaron al tubo #2 (ver Figura 10).

Se numeraron 15 tubos eppendorf del 3-7 y con las letras A, B y C correspondiente a cada triplicado. Del tubo #2 se tomaron alícuotas de 0.5mL y se pasaron a 15 tubos eppendorf mantenidos en hielo, que correspondieron a las concentraciones de 300, 150 y 75 $\mu\text{g/mL}$ de Rioloatriona solubilizada en advanced-DMEM al 1% de DMSO y esterilizada por filtración, el control positivo (C^+) etanol 40%, control negativo (C^-) y el CC, todos fueron llevados a 1 mL de solución. Los 15 tubos fueron mantenidos a 4°C.

Una monocapa de 100,000 células Vero por pozo fue infectada con 0.1 mL de los tubos (25 UFP/pozo) enumerados anteriormente del 3-7, los pozos se llevaron a 1 mL de solución y se incubó la placa 1 h a 37°C en agitación constante. A continuación, se desechó el sobrenadante y se agregó advanced-DMEM suplementado con 0.32% de IgG. Las células se incubaron 48 h. Por último, las células en los pozos se fijaron con 1 mL de metanol y se tiñeron con 1 mL de Giemsa. Se realizó conteo de placas formadas.

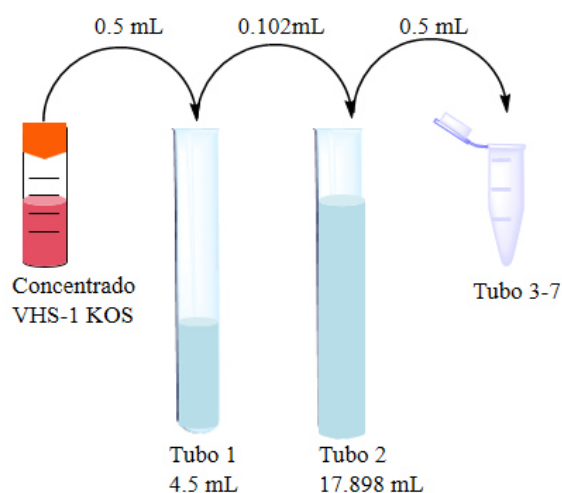


Figura 10. Diluciones del concentrado viral para el ensayo de actividad virucida

2.2.6 Ensayo actividad protectora

Se sembró una monocapa de 100,000 células Vero por pozo en tres placas de 24 pozos, las placas fueron tratadas 24 h, 12 h y 1 h antes de la infección con 300, 150 y 75 µg/mL de Rioloatriona solubilizada en advanced-DMEM al 1% de DMSO y esterilizada por filtración.

Una vez transcurrido el tiempo de pretratamiento, se utilizaron 4 tubos 16 x 150 mm con tapón de aluminio, a los cuales se les adicionaron 4.5 mL de PBS glucosado al 0.1%. Una vez que se enumeraron los tubos, se tomó 0.5 mL de la solución del concentrado viral de VHS-1 y se depositó en el tubo #1, se agitó y a partir de este tubo se hicieron diluciones logarítmicas (1:10) hasta el tubo #4. Se eliminó el medio de los pozos, del tubo #4 se tomaron 0.25 mL correspondiente a aproximadamente a 25 UFP y se incubó 1 h a 37°C en agitación constante. A continuación, se desechó el sobrenadante y se agregó advanced-DMEM suplementado con 0.32% de IgG. Las células se incubaron 48 h. Se utilizaron controles CC, C⁻ y como C⁺ ACV (2 µg/mL) esterilizado por filtración. Por último, las células en los pozos se fijaron con 1 mL de metanol y se tiñeron con 1 mL de Giemsa y se realizó el conteo de placas formadas. El ensayo del tiempo a 12 h se realizó por sextuplicado.

2.2.7 Determinación del título del concentrado viral a 4°C

El título viral (concentración de UFP/mL) se realizó mediante infección con diferentes volúmenes del concentrado de VHS-1 KOS. Se sembraron 100,000 células Vero por pocillo en 1 placa de 24 pozos, se incubó 30 min a 4°C, luego se depositaron 0.02, 0.03 y 0.04 mL del concentrado viral en su pozo correspondiente y se incubó durante 2 h a 4 °C. A continuación, se desechó el sobrenadante y se agregó advanced-DMEM suplementado con 0.32% de IgG. Las células se incubaron 48 h. Se utilizó control de crecimiento celular (CC). Por último, las células en los pozos se fijaron con 1 mL de metanol y se tiñeron con 1 mL de Giemsa. Se realizó conteo de placas formadas y se determina en cuál de los pozos se obtiene la aproximadamente de 25 UFP.

2.2.8 Ensayo de inhibición de la adherencia

Se sembró una monocapa de 120,000 células por pozo en una placa de 24 pozos. Esta fue incubada 30 minutos a 4°C, posteriormente se infectó con 0.02 mL del concentrado viral (25 UFP/pozo) al mismo tiempo se añadieron 300, 150 y 75 µg/mL, de Rioloatriona solubilizada en advanced-DMEM al 1% de DMSO. Se utilizaron controles CC, C⁻ y como C⁺ heparina a una concentración de 5 µg/mL y esterilizada por filtración, todos fueron llevados a 1 mL de solución. La placa se incubó 2 h a 4°C, después se le realizaron 2 lavados con PBS frío y por último se agregó advanced-DMEM suplementado con 0.32% de IgG. Las células se incubaron 48 h. Por último, las células en los pozos se fijaron con

1 mL de metanol y se tiñeron con 1 mL de Giemsa y se realizó el conteo de placas formadas.

2.2.9 Ensayo de inhibición de la entrada

Se sembró una monocapa de 120,000 células por pozo en 4 placas de 24 pozos. Se utilizaron 3 tubos de vidrio 16 x 150 mm con tapón de aluminio, a los cuales se les adicionaron 4.5 mL de PBS glucosado al 0.1%. Una vez que se enumeraron los tubos, se tomó 0.5 mL de la solución del concentrado de VHS-1 y se depositó en el tubo #1, se agitó y a partir de este tubo se hicieron diluciones logarítmicas (1:10) hasta el tubo #3. La placa de 24 pozo fue pre-incubada 30 minutos a 4°C e infectada 0.25 mL del tubo #3 (25 UFP/pozo), luego se incubó 2 h a 4°C, las células se lavaron con PBS frío, después se les añadió 300, 150 y 75 µg/mL, de Rioloatriona solubilizada en advanced-DMEM al 1% de DMSO, las placas se incubaron a diferentes tiempos (30 y 60 minutos) a 37°C, después se eliminó el medio y se añadió buffer de citratos pH 3, se realizó un lavado con PBS y por último se agregó advanced-DMEM suplementado con 0.32% de IgG. Las células se incubaron 48 h. Se utilizaron controles CC, C⁻ y como C⁺ ACV (2 µg/mL) esterilizado por filtración. Por último, las células en los pozos se fijaron con 1 mL de metanol y se tiñeron con 1 mL de Giemsa y se realizó el conteo de placas formadas. El ensayo al tiempo de 1 h se llevó a cabo por sextuplicado.

2.2.10 Obtención de las proteínas de los diferentes modelos

Los ensayos de protección 12 h y entrada 1 h se realizaron por sextuplicado, la mitad fue utilizada para la obtención de la ICP 0 e ICP 8 de las infecciones por VHS-1 mediante electroforesis de una dimensión en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y posteriormente analizadas por Western blot.

Una vez transcurridas las 48 h se desechó el medio, las células fueron lavadas dos veces con PBS, se añadió el buffer de lisis (RIPA-buffer con inhibidor de proteasas e inhibidor de fosfatasa) se cosecharon mediante una espátula (scraper), la suspensión de células infectadas fue transferida a un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocó 10 segundos en vortex y mantenida 20 minutos en hielo y centrifugada a 13,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue recuperado en tubos eppendorff de 0.7 mL. Finalmente, la concentración de las proteínas totales fue determinada por el método de Bradford.

2.2.11 Análisis de proteínas mediante Western Blot

Para el ensayo de western blot se utilizaron 35 µg de proteína total. Previo a su resolución en el gel de poliacrilamida, fueron desnaturizadas con el buffer de carga a 95°C por 5 min. Posteriormente fueron resueltas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), que consistió en un gel separador al 10 % y un gel concentrador al 5%, esto en un periodo de aproximadamente 2 horas a 80 volts. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, por 11

horas a 20 volts en frío. Una vez terminada la transferencia la membrana fue lavada 3 veces con TBS-T 0.1% por 5 min y 1 lavado con TBS también por 5 min. Posteriormente, se bloqueó con BSA al 5% por una hora y se realizaron lavados para eliminar el exceso de solución de bloqueo. La membrana fue incubada con los anticuerpos primarios anti-ICP-8, anti-ICP-0, y anti-GADPH, a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados de 10 min. cada uno con amortiguador TBS-T 1X 0.1%. A continuación, se adicionó el anticuerpo secundario correspondiente a cada anticuerpo primario y se dejó incubando y en agitación por 1 hora. Para finalizar se realizaron 3 lavados con amortiguador TBS-T 1X 0.1% y uno con TBS-T 1X y se procedió con el revelado. La presencia de la reacción antígeno-anticuerpo fue visualizada empleando un kit de Quimioluminiscencia de Thermo Scientific y se tomó la imagen por un fotodocumentador de quimioluminiscencia de Bio Rad utilizando el software Image Lab.

2.2.12 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados empleando una prueba de Dunnett con el programa GraphPad Prism 7. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de $p \leq 0.05$.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Estandarización del número de células por pozo

Se determinó que para obtener una monocapa de células por pozo con una confluencia del 90% se tenían que sembrar entre 100,000 a 120,000 células por pozo.

3.2 Determinación del título del concentrado viral a 37°C

Se determinó la concentración de UFP/mL en el concentrado de VHS-1 KOS como se describió en la sección 2.2.4. En la tabla 5 se muestra el número de tubo/pozo y la dilución con el que se obtuvo la cantidad inmediata superior a 25 UFP para el ensayo con VHS-1.

Se determinó la concentración de UFP/mL del concentrado viral utilizando los valores de la tabla 5 de la siguiente manera:

Cálculos para el concentrado de VHS-1 KOS con 0.1 mL del tubo #4:

$$\frac{11 \text{ UFP}}{0.0001} = 110,000 \text{ UFP} \times 10 = 1,100,000 \frac{\text{UFP}}{\text{mL}}$$

Se calculó como se describió en la sección 2.2.4 el volumen necesario del tubo 4 para obtener 25 UFP de VHS-1 de la siguiente manera:

$$\frac{25 \text{ UFP}}{110 \text{ UFP/mL}} = 0.227 \text{ mL del tubo 4}$$

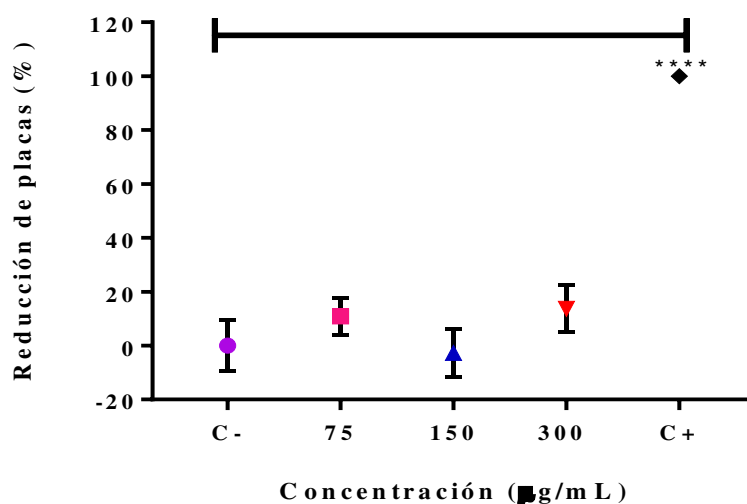
Tabla 5.UFP contadas en cada tubo utilizado en el ensayo de reducción de placas virales a 37°C

No. de tubo	Dilución	Factor de dilución (FD)	UFP contadas de VHS-1
1	1:1x10 ¹	0.1	No determinado
2	1:1x10 ²	0.01	No determinado
3	1:1x10 ³	0.001	No determinado
4	1:1x10 ⁴	0.0001	11
5	1:1x10 ⁵	0.00001	0
6	1:1x10 ⁶	0.000001	0

3.3 Determinación de la actividad virucida

Se determinó la actividad virucida de Rioloatriona, para lo cual las partículas virales fueron puestas primero en contacto con Rioloatriona y luego la solución preparada fue utilizada para infectar las células. Una vez que se realizó el conteo de las placas virales se calculó el porcentaje de reducción de placas, después el promedio y la desviación estándar de los triplicados fue representado en una gráfica de las diferentes concentraciones de Rioloatriona y los controles vs el porcentaje de reducción de placas. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba de Dunnett ($p \leq 0.05$), la cual

sirve para comparación de medias de los tratamientos probados vs el control negativo. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el control negativo y las diferentes concentraciones de Rioloatriona, lo que significa que no hay actividad virucida (ver gráfica 1).

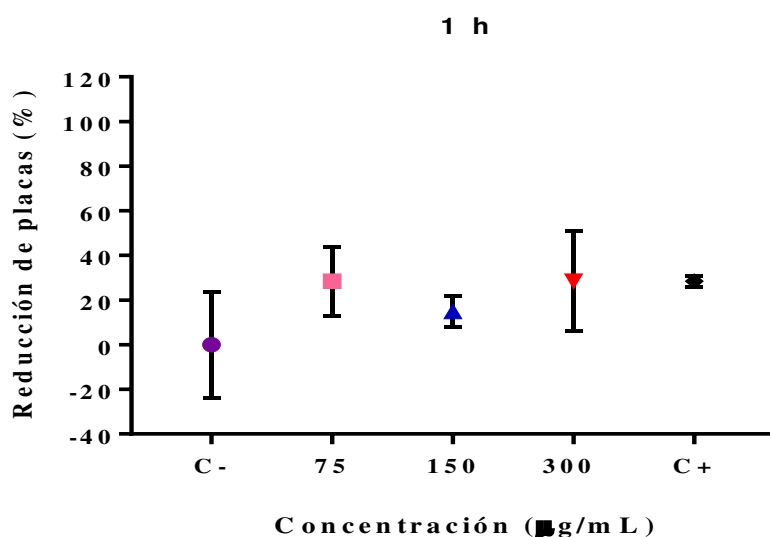


Gráfica 1. Resultados de las partículas virales puestas en contacto 1 h con Rioloatriona. Se representa el promedio y desviación estándar de 3 ensayos independientes. Analizados mediante prueba de Dunnett con ($p \leq 0.05$). **** $p < 0.0001$

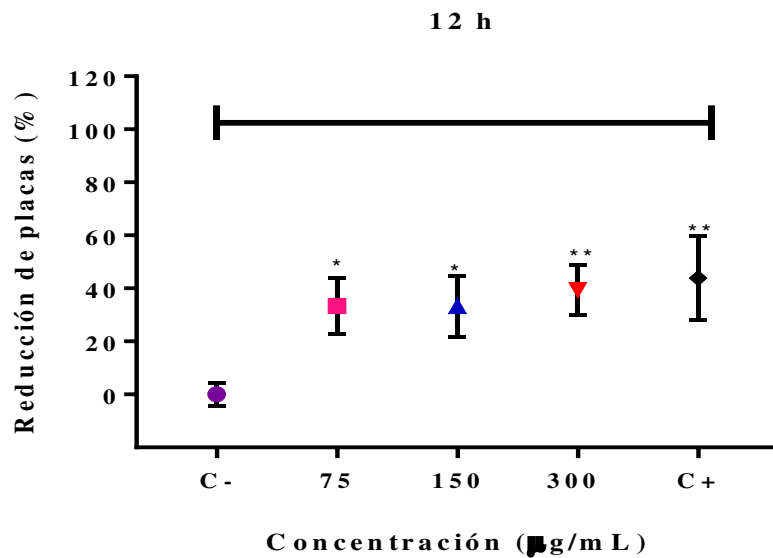
3.4 Determinación de la actividad protectora

El siguiente ensayo desarrollado que también estudia el estadio pre-infección fue el de actividad protectora, pero este por otra parte evaluó si Rioloatriona ejercía algún efecto protector sobre las células, evitando así la infección por las partículas virales.

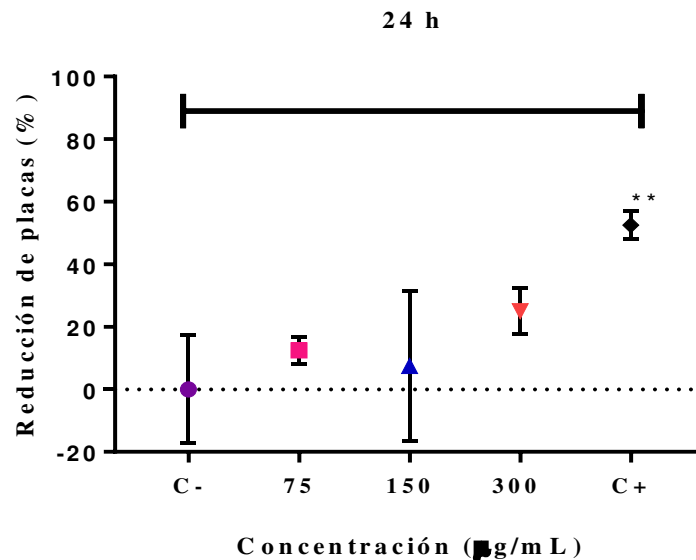
Se determinó que Rioloatriona no ejerce un efecto protector cuando las células son pre-tratadas 1 h y 24 h antes de la infección (ver gráfica 2 y 4). Por otro lado, si se observó un efecto protector cuando las células son tratadas 12 h antes de realizar la infección, esto al calcularse la IC_{50} $219.1386 \pm 38.9603 \mu\text{g/mL}$ (ver tabla 6). Además, después de calcular el porcentaje de reducción de placas, se realizó el análisis estadístico con una prueba de Dunnett encontrándose diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) del control negativo de tratamiento con las tres concentraciones de Rioloatriona probadas (ver gráfica 3).



Gráfica 2. Resultados de células pre- tratadas 1 h con Rioloatriona y posterior contacto con las partículas virales. Se representa el promedio y desviación estándar de 3 ensayos independientes. Analizados mediante prueba de Dunnett ($p \leq 0.05$).



Gráfica 3. Resultados de células pre- tratadas 12 h con Riolozatriona y posterior contacto con las partículas virales. Se representa el promedio y desviación estándar de 3 ensayos independientes. Analizados mediante prueba de Dunnett con ($p \leq 0.05$). * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$



Gráfica 4. Resultados de células pre- tratadas 24 h con Riolozatriona y posterior contacto con las partículas virales. Se representa el promedio y desviación estándar de 3 ensayos independientes. Analizados mediante prueba de Dunnett con ($p \leq 0.05$). ** $p < 0.01$

Tabla 6. Determinación de la IC₅₀

Ensayo	IC ₅₀	D.E.
Protección 1 h	No se determinó	No se determinó
Protección 12 h	219.1386 µg/mL	± 38.9603 µg/mL
Protección 24 h	No se determinó	No se determinó

3.5 Determinación del título del concentrado viral a 4°C

En la siguiente tabla se muestran los valores de UFP/pozo obtenidas para la infección con diferentes volúmenes tomados a partir del concentrado de VHS-1 KOS.

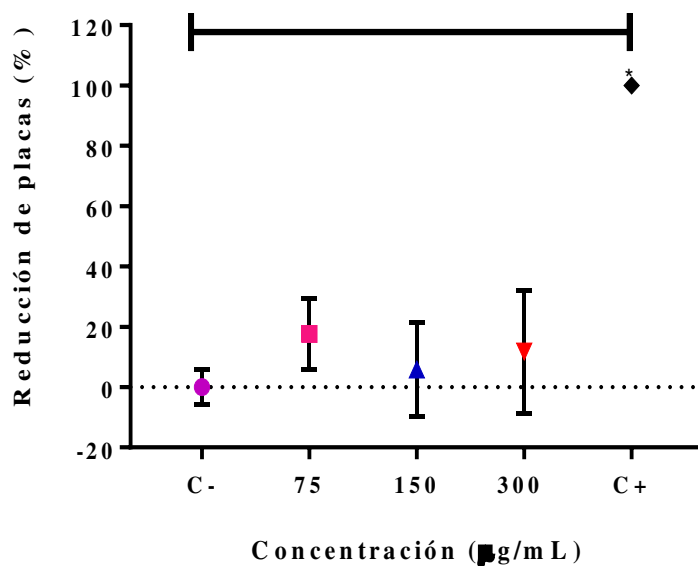
Tabla 7. UFP contadas en cada pozo en el título viral a 4°C

Volumen de infección	UFP por pozo contadas
0.02 mL	27
0.03 mL	36
0.04 mL	35

3.6 Determinación de la inhibición de la adherencia

Se determinó la actividad de Riolozatriona para evitar que las partículas virales se adhirieran a las células, evitando así la infección viral. Con los resultados obtenidos del ensayo se calculó el porcentaje de reducción de placas, se realizó el análisis estadístico

con una prueba de Dunnett encontrándose que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) entre el control negativo de tratamiento y las tres concentraciones de Rioloatriona probadas (ver gráfica 5).

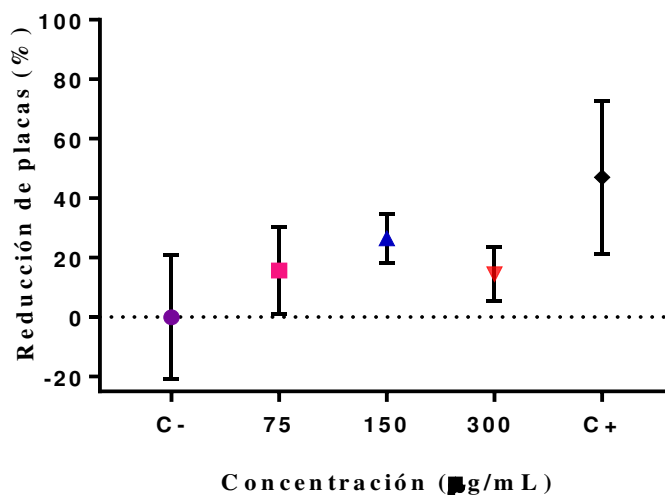


Gráfica 5. Resultados de la evaluación de la inhibición de la adherencia de la partícula viral a la célula. Se representa el promedio y desviación estándar de 3 ensayos independientes. Analizados mediante prueba de Dunnett con ($p \leq 0.05$). ** $p < 0.01$

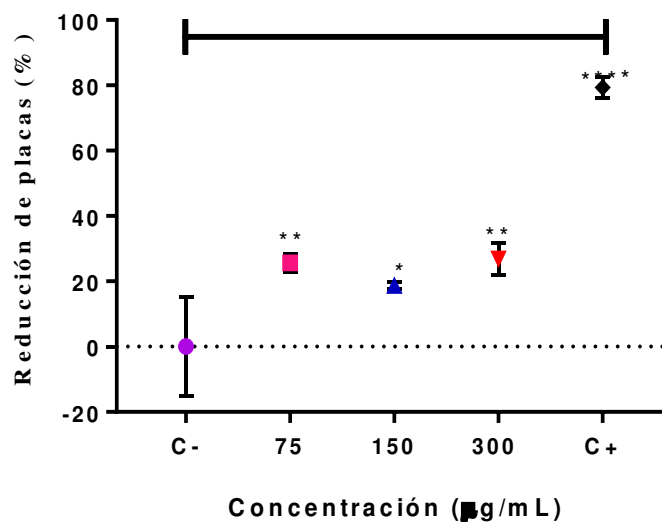
3.7 Determinación de la inhibición de la entrada

Se determinó la actividad de Rioloatriona para evitar que las partículas virales entraran a las células, interrumpiendo así la infección viral. Se calculó el porcentaje de reducción de placas obtenido a las tres concentraciones probadas y los dos tiempos utilizados (30 min y 1 h), se realizó el análisis estadístico mediante una prueba de Dunnett encontrándose que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) entre el control negativo

de tratamiento y las tres concentraciones de Rioloatriona probadas al tiempo de 30 min (ver gráfica 6), caso contrario a lo que paso al tiempo de 1 h (ver gráfica 7) donde si hubo diferencia estadísticamente significativa.



Gráfica 6. Resultados de la evaluación de la inhibición de la entrada de la partícula viral a la célula a los 30 min. Se representa el promedio y desviación estándar de 3 ensayos independientes. Analizados mediante prueba de Dunnett con ($p \leq 0.05$). ** $p < 0.01$



Gráfica 7. Resultados de la evaluación de la inhibición de la entrada de la partícula viral a la célula al tiempo de 1 h. Se representa el promedio y desviación estándar de 3 ensayos independientes. Analizados mediante prueba de Dunnett con ($p \leq 0.05$). ** $p < 0.01$.

3.8 Análisis de las proteínas mediante Western Blot

Para evaluar la respuesta al tratamiento con Rioloatriona a nivel traduccional, se obtuvieron las proteínas en los ensayos donde hubo diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo (Protección 12 h y entrada 1 h). Una vez cuantificada la proteína se utilizaron 35 μ g para correr el gel de poliacrilamida al 10 % (gel separador). Posteriormente se realizó la transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa y se procedió con el inmunoblot, el resultado de la reacción de quimioluminiscencia se muestra en las figuras 11, 12 y 13.

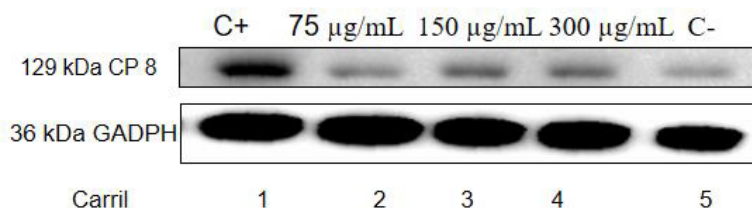
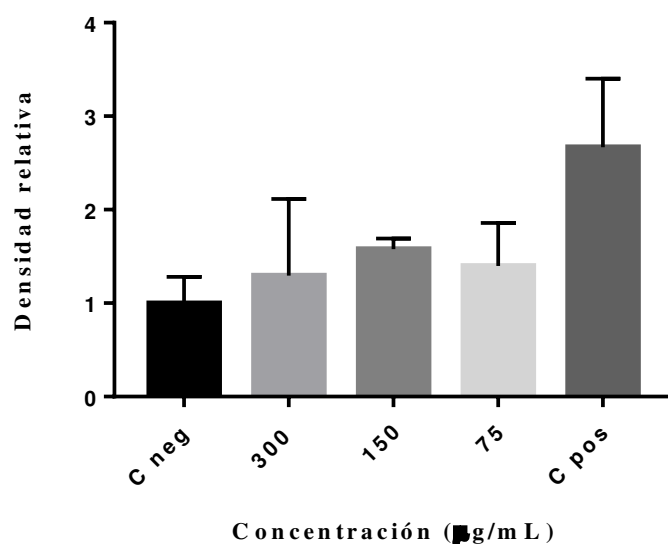


Figura 11. Western blot de la proteína viral ICP8. Ensayo Protección 12 h

Se realizó el análisis densimétrico del triplicado de imágenes y se normalizaron los resultados obtenidos con GADPH. El software utilizado para el análisis fue el ImageJ. En la gráfica se presenta el resultado al analizar los triplicados



Gráfica 8. Resultados del análisis densitométrico del triplicado del Western Blot de la proteína viral ICP 8 en el ensayo de protección 12 h. Los datos fueron normalizados con GADPH y posteriormente se compararon con el control negativo de tratamiento dándole el valor de 1 a este último. Las medias se analizaron mediante prueba de Dunnett ($p \leq 0.05$). Se puede observar que no hubo diferencia estadísticamente significativa en la expresión de la cantidad de proteína a las concentraciones de Riolozatriona utilizadas, sin embargo, se puede observar un efecto con un comportamiento que no es dosis-dependiente.

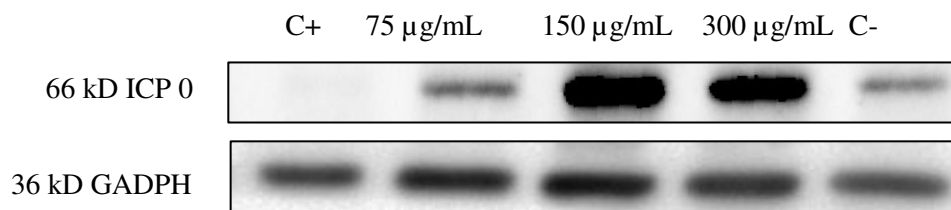
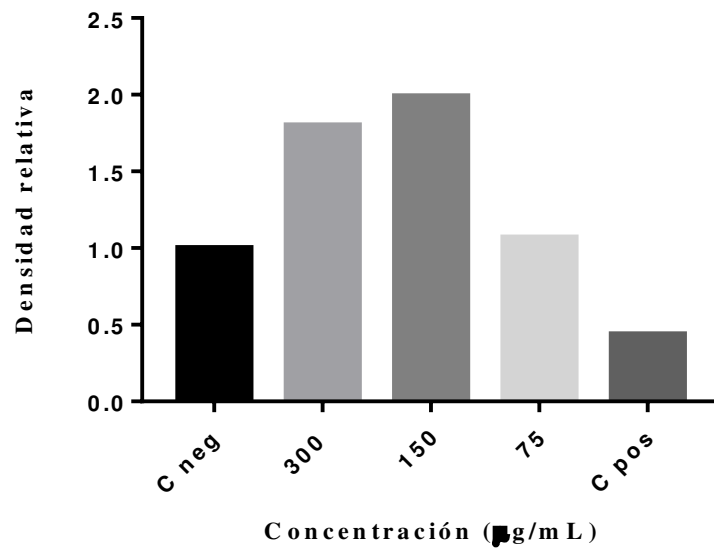


Figura 12. Western blot de la proteína viral ICP 0. Ensayo Entrada 1 h



Gráfica 9. Resultados del análisis densitométrico del Western Blot de la proteína viral ICP 0 en el ensayo de entrada 1 h. Los datos fueron normalizados con GADPH y posteriormente se compararon con el control negativo de tratamiento dándole el valor de 1 a este último.

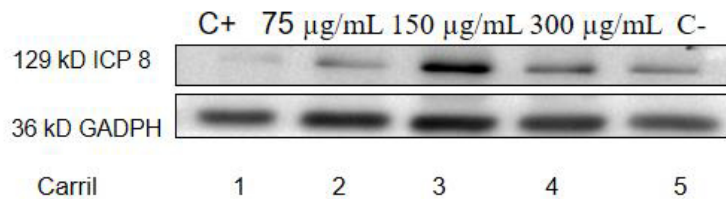
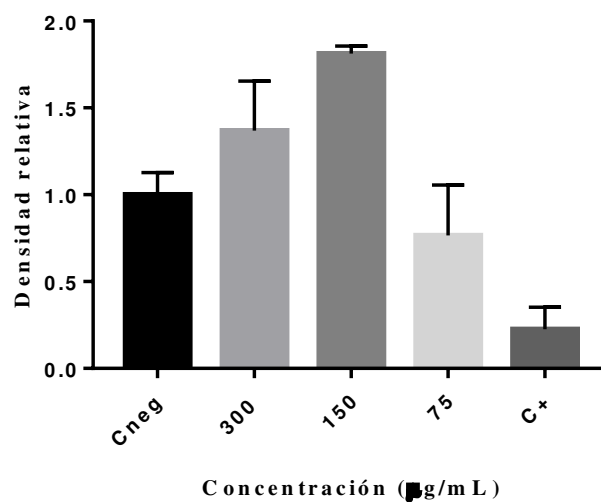


Figura 13. Western blot de la proteína viral ICP 8. Ensayo Entrada 1 h



Gráfica 10. Resultados del análisis densitométrico del triplicado del Western Blot de la proteína viral ICP 8 en el ensayo de entrada 1 h. Los datos fueron normalizados con GADPH y posteriormente se compararon con el control negativo de tratamiento dándole el valor de 1 a este último. Las medias se analizaron mediante prueba de Dunnett ($p \leq 0.05$). Se puede observar que no hubo diferencia estadísticamente significativa en la expresión de la cantidad de proteína a las concentraciones de Rioloatriona utilizadas, sin embargo, se puede observar un efecto con un comportamiento que no es dosis-dependiente.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se desarrollaron ensayos preliminares de la actividad de Rioloatriona en los estadios tempranos de la infección. Esto basándose en los antecedentes de Silva Mares y cols. en el año del 2013, en la tesis doctoral de Melchor Martínez, así como en las tesis de Maestría de Estrada Chavarría y Tamez Fernández, este último determinó que Rioloatriona además de tener una actividad anti-herpética *in vitro* también tiene actividad *in vivo* (22,25–27).

La replicación del VHS-1 se caracteriza por una secuencia compleja que involucra varios pasos en los que los agentes antivirales pueden interferir. Para investigar la actividad que tiene Rioloatriona sobre VHS-1, esta se agregó en diferentes estadios durante etapas tempranas de la infección viral.

4.1 Estandarización del número de células por pozo

En los ensayos de actividad virucida y protección se observó que se tenía una monocapa de células adecuada (90-95% de confluencia) cuando se sembraban 100,000 células por pozo. Por otro lado, para los ensayos de inhibición de la adherencia y entrada se decidió

sembrar 120,000 células, esto debido a la temperatura (4°C) a las que fueron sometidas, aunado a que mejora la tinción con Giemsa. Además, se encontró que la cantidad de células por pozo varía dependiendo del autor, ya que puede ser 50,000, 100,000, 125,000 e inclusive hasta 250,000, esto cuando se trata de placas de 24 pozos, por lo que las cantidades utilizadas estuvieron de acuerdo a lo reportado en la literatura (29–32).

4.2 Determinación del título del concentrado viral a 37°C

Se determinó que el concentrado de VHS-1 KOS utilizado en los ensayos contenía la cantidad teórica de 1;100,00 UFP/mL, lo cual es importante para calcular el volumen del “tubo título” que se necesitó para inocular todos los pozos con 25 UFP a excepción del pozo de CC. Se observó que el “tubo título” para VHS-1 KOS era el tubo 4 y que el volumen a tomar del “tubo título” era de 0.227 mL. Otros autores infectaron para tener de 10-100 UFP por pozo, esto cuando se trata de placas de 24 pozos (29,30,33,34). Sin embargo, se decidió que la cantidad idónea era de 25 UFP por pozo, ya que con dicha cantidad se evitó un conteo erróneo y se podían distinguir adecuadamente una placa viral de otra. Por lo tanto, para los ensayos de actividad virucida y protección se realizó el cálculo correspondiente para tener aproximadamente 25 UFP/pozo (ver sección 3.2).

4.3 Determinación de la actividad virucida

Para evaluar la actividad de Rioloatriona en el estadio de pre-infección se utilizaron dos ensayos diferentes. El primero para evaluar la actividad para inactivar a las partículas virales antes de que estas entraran en contacto con la célula.

Se determinó que Rioloatriona no tiene actividad virucida a las diferentes concentraciones probadas y al tiempo probado (1 h). En la literatura se encontró que hay fracciones de butanol y ácido acético que tienen actividad virucida contra VHS-1 8 ACV (aciclovir-resistente) y 8WC (aciclovir-sensible); dichas fracciones se obtuvieron a partir de la planta *Phyllanthus orbicularis* que pertenece a la familia *Euphorbiaceae* (35), misma familia a la que pertenece *Jatropha dioica*, planta de la cual se obtiene Rioloatriona. Sin embargo, ellos mencionan que algunos de los constituyentes de dichas fracciones son compuestos de tipo polifenol y no de tipo terpeno. Los mismos autores ya habían evaluado la actividad virucida, pero de un extracto acuoso de la misma planta, y de igual manera este presentó actividad virucida contra los mismos tipos de virus (32).

Benzekri y cols., atribuyen la acción virucida al bloqueo de receptores específicos localizados en la envoltura, los cuales están involucrados en el reconocimiento y unión de sus receptores de células diana. Esto lo confirmaron al tratar con el extracto metanólico a otro virus envuelto (Sincitial Respiratorio) y a dos desnudos (Adenovirus tipo 5 y Coxsackie B tipo 3), presentándose solo actividad virucida en el caso del virus envuelto (36).

Por otro lado, Kutluay y cols. mencionan que la actividad virucida de la curcumina se puede deber a un efecto bioquímico en la estructura o integridad de la partícula viral (37).

4.4 Determinación de la actividad protectora

El segundo ensayo utilizado para evaluar la actividad en el estadio de pre-infección fue el de actividad protectora, dicho ensayo evaluó si Rioloatriona ejercía algún efecto protector sobre las células, evitando así la infección por las partículas virales.

Se determinó que Rioloatriona protege a las células de la infección por las partículas virales cuando las células fueron tratadas 12 h antes de realizar la infección, esto al calcularse la IC_{50} $219.1386 \pm 38.9603 \mu\text{g/mL}$. Además, después de calcular el porcentaje de reducción de placas con respecto al control negativo de infección, se realizó el análisis estadístico con una prueba de Dunnett ($p \leq 0.05$) encontrándose diferencia estadísticamente significativa respecto del control negativo con las tres concentraciones de Rioloatriona probadas.

Chuanasa y cols. determinaron que el Oxiresveratrol un metabolito secundario de tipo estilbenoide, presentó una actividad antiviral cuando las células son tratadas 1 h antes de la infección, efecto que no se observó al tratar a las células con Rioloatriona a ese tiempo. Los autores le atribuyen dicha actividad a una interferencia del Oxiresveratrol con la adsorción del virus. Además, realizaron el análisis de proteínas mediante inmunoprecipitación y SDS-PAGE encontrando que hubo una disminución en la síntesis

de proteínas tardías Por otro lado, mencionan que la actividad anti-VHS también se relaciona con la mayor eficacia con el pretratamiento de Oxiresveratrol (antes de la infección viral) en la infección cutánea por VHS-1 en ratones (38).

Sirada y cols. determinaron que su extracto de cloroformo y los compuestos obtenidos diglicérido monogalactosil y el diglicérido digalactosil mostraron un efecto protector del 50 % contra VHS-1 y VHS-2 cuando las células eran tratadas 24 h pre-infección, efecto que no se observó cuando las células se trataron 24 h con Rioloatriona (39).

Nuestros resultados demuestran que Rioloatriona reduce entre un 33-39% las placas virales formadas cuando las células son tratadas 12 h antes de realizar la infección. Se analizó la expresión de la proteína viral temprana ICP 8, una proteína de unión al ADN monocatenario que es necesaria y suficiente para la replicación viral en células infectadas. Cuando las células son tratadas con Rioloatriona, se observa que no hubo una disminución en la expresión y que no hay un efecto dosis-dependiente, lo que sugiere que no hay un efecto en la etapa intermedia del ciclo de replicación viral, por lo que seguramente no hay un efecto en las etapas tempranas, ya que la traducción de las proteínas tempranas es estimulada por genes tempranos-inmediatos. Sin embargo, queda pendiente analizar si hay un efecto antes de que se lleve a cabo la traducción de las proteínas tardías, ya que estas son las que constituyen a las proteínas estructurales del virus como lo son la VP 5 que es la principal proteína de la cápside o la VP 21 que puede servir como andamio para el ensamblaje de la cápside (3). Por lo que sería necesario evaluar la expresión de los diferentes tipos de genes mediante técnicas de Biología

Molecular como lo es la qPCR y con ello evaluar directamente que gen o genes se encuentran afectados por el efecto de Rioloatriona.

4.5 Determinación del título del concentrado viral a 4°C

Debido a que al realizar el ensayo de inhibición de la adherencia se observó que no había células infectadas por el virus cuando la infección se hizo con el tubo correspondiente a la dilución $1:1 \times 10^4$ del concentrado viral, ni aun cuando la cantidad de UFP se duplico, fue necesario realizar el título viral bajo las condiciones en las que se realizó el ensayo de inhibición de la adherencia para determinar la cantidad necesaria para tener 25 UFP/pozo, después de que se hizo el conteo de las placas virales se decidió que la infección se realizaría tomando 0.04 mL directamente del concentrado de VHS-1 KOS.

4.6 Determinación de la inhibición de la adherencia

El primer paso en el ciclo de infección de VHS-1 es la adherencia de las partículas virales a la célula, esto mediante diferentes glucoproteínas presentes en la envoltura del virus, las cuales interaccionan con diferentes tipos de receptores presentes en la membrana de la célula diana. Con la finalidad de evaluar si Rioloatriona evitaba que lo anterior sucediera, se desarrolló el ensayo de inhibición de la adherencia.

Se determinó que Rioloatriona no evita que la partícula viral se adhiera a la célula, ya que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones probadas de Rioloatriona y el control negativo de infección.

Liang y cols., determinaron que el Ácido chebulagico y la Punicalagina evitan que la partícula viral se adhiera a células A549. Ellos usaron la técnica de ELISA para detectar las partículas virales unidas a las células adherentes, y observaron que ambos compuestos de tipo tanino inhibían la unión de VHS-1 a la superficie de las células A549 de una manera dosis-independiente. Estos resultados les sugirieron que Ácido chebulagico y Punicalagina podrían interactuar con glucoproteína (s) viral (es) y/o receptor (es) celular (es) durante la fase de unión del virus (40).

De Oliveira y cols. demostraron que la Teaflavina-3,3-digallate evitaba que la partícula viral entrara a la célula diana debido a que interfiere con la unión-adsorción a los receptores de la célula (41).

4.7 Determinación de la inhibición de la entrada

El primer paso en el estadio de post-infección es la entrada de la cápside viral a la célula, una vez que esta entra a la célula se desplaza hacia el núcleo donde se desarma liberando su ADN viral e inicia el estadio de replicación viral. El ensayo desarrollado evaluó la actividad de Rioloatriona para inhibir la entrada de la partícula viral deteniendo de esta forma la replicación de las partículas virales.

Se determinó que Rioloatriona evita que la partícula viral entre a la célula al tiempo de 1 h, ya que a dicho tiempo hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones probadas de Rioloatriona y el control negativo de infección. Dicho efecto no se observó al tiempo de 30 minutos.

Existen diversos reportes en los cuales extractos obtenidos de diferentes plantas evitan que la partícula viral entre a la célula, uno de ellos es por Nocchi y cols., quienes demostraron que su extracto hidroetanólico inhibió la infectividad de VHS-1 durante las etapas adherencia y entrada, bloqueando así la entrada de la partícula viral (29). Esto lo confirmaron mediante Western Blot, donde hubo una disminución en la expresión de las glucoproteínas gB, gC y gD.

Por otro lado, Zhang y cols. determinaron que el complejo lignina-carbohidrato podía bloquear dos pasos tempranos del ciclo de replicación viral: la adherencia y entrada. Además, los autores sugieren que la proteína blanco no es la gC, esto debido a que fue igualmente efectivo para prevenir la entrada del VHS-1 deficiente de gC y el VHS-1 (42).

Una vez que se realizó el análisis de la expresión de las proteínas virales en el ensayo de entrada 1 h, se observó que en el caso de la ICP 0 una proteína inmediata-temprana no hubo un efecto dosis-dependiente, ya que a la concentración de 150 µg/mL hubo una mayor expresión de la proteína, en cuanto a la ICP 8 una proteína temprana, se observa que no hubo una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de la proteína y el control negativo de infección, por lo que se pudo determinar que no hay actividad

inhibitoria en la etapas temprana e intermedia del ciclo de replicación viral. Sin embargo, sería necesario evaluar si existe actividad en la etapa tardía del ciclo de replicación viral, es decir, si el efecto que se observó en el ensayo de entrada 1 h se debe a que Rioloatriona está afectando a las proteínas involucradas en el ensamblaje de la cápside o en la exocitosis de la partícula viral de la célula o en el paso de célula-célula.

Con base a los resultados obtenidos, se demostró que Rioloatriona protege a las células de la infección por VHS-1 e inhibe la entrada de la partícula viral a la célula al tiempo de 1 h. El análisis de las proteínas virales mediante Western Blot, involucradas en las etapas temprana e intermedia del ciclo de replicación viral, no demostró que la actividad de Rioloatriona estuviera involucrada en la inhibición de la expresión de dichas proteínas.

Sin embargo, es necesario realizar más ensayos para establecer un perfil proteómico con el fin de determinar las proteínas involucradas en el mecanismo de acción.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Con respecto al efecto *in vitro* de Rioloatriona en la vía de infección por VHS-1:

- Se determinó que éste diterpenoide no tiene capacidad de inactivar a las partículas virales, antes de que entren en contacto con las células.
- Se observó un efecto protector contra la infección por VHS-1 cuando las células son tratadas 12 h antes con Rioloatriona.
- Rioloatriona no tiene efecto inhibitorio sobre la adherencia de VHS-1 en células Vero.
- Se determinó que Rioloatriona si ejerce un efecto inhibitorio en la entrada de la partícula viral a la célula.
- No se observó inhibición en la expresión de la proteína ICP-8 en el ensayo de protección 12 h.
- No se observó efecto inhibitorio en la expresión de las proteínas ICP 8 e ICP 0 en el ensayo de entrada 1 h.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

- Utilizar los ensayos desarrollados para evaluar la actividad de Rioloatriona contra VHS-2 en la etapa temprana del ciclo de infección viral.
- Evaluar la actividad de Rioloatriona en la etapa tardía del ciclo de infección viral.
- Analizar por técnicas de Biología Molecular la expresión de los diferentes genes (inmediatos-tempranos, tempranos y tardíos), por el efecto de Rioloatriona en el ciclo de replicación viral.
- Determinar las proteínas involucradas en el mecanismo de acción.
- Evaluar la sinergia de Rioloatriona con el Aciclovir en el ciclo de replicación viral.
- Evaluar la actividad de Rioloatriona en el ciclo de replicación viral de cepas ACV-resistentes.

CAPÍTULO 7

REFERENCIAS

1. Virus del herpes simple [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/es/>
2. Carballal Guadalupe OJR. Virología Médica. 2014.
3. Knipe DHP. Fields Virology. Sixth edit. Cohen, JeffreyI, Griffin Diane E., Lamb RA, editor. Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
4. Suresh K V. Pathogenesis and life cycle of herpes simplex virus infection-stages of primary, latency and recurrence. J Oral Maxillofac Surgery, Med Pathol [Internet]. 2016;4–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajoms.2016.01.006>
5. Looker KJ, Magaret AS, May MT, Turner KME, Vickerman P, Gottlieb SL, et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. 2015;1–17.
6. Corona-oregón E, Conde-gonzález CJ, Barrón L. Virus del herpes simplex tipo 1 : un posible agente de transmisión sexual en población universitaria. 2010;146(2):98–102.
7. Murray Patrick, Rosenthal Ken PM. Microbiología Médica. Séptima ed. 2013.
8. Shors T. Virus: Estudio molecular con orientación clínica. Primera ed. Médica Panamericana; 2009.
9. Shukla D, Spear PG. Herpesviruses and heparan sulfate : an intimate relationship in aid of viral entry. 2001;108(4):503–10.
10. Spear PG, Manoj S, Yoon M, Jogger CR, Zago A, Myscofski D. Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. 2006;344:17–24.
11. Akhtar J, Shukla D. Viral entry mechanisms : cellular and viral mediators of herpes

- simplex virus entry. 2009;276:7228–36.
12. Elion GB. Acyclovir: Discovery, Mechanism of Action, and Selectivity. *J Med Virol*. 1993;2–6.
 13. Griffiths PD. A perspective on antiviral resistance. 2009;46:3–8.
 14. Birkmann A, Zimmermann H. ScienceDirect HSV antivirals – current and future treatment options. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2016;18:9–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2016.01.013>
 15. Ibarra-Alvarado C, Rojas A, Mendoza S, Bah M, Gutiérrez DM, Hernández-Sandoval L, et al. Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharm Biol* [Internet]. 2010;48(7):732–9. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880200903271280>
 16. Abel C, Busia K, Med HH. *Herbal Medicine in Ghana An Exploratory Ethnobotanical Study of the Practice of Herbal Medicine by the Akan Peoples of Ghana Herbal Medicine in Ghana*. 2005;10(2).
 17. Sarker, Satyajit D., Latif, Zahid, Gray AI. *Natural Product Isolation*. 2nd editio. Humana Press Inc.; 2006.
 18. Patridge E, Gareiss P, Kinch MS, Hoyer D. An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. *Drug Discov Today* [Internet]. 2016;21(2):204–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2015.01.009>
 19. Márquez E. Aprovechamiento de la sangre de drago. *Boletín de Experiencias Relevantes en la Prestación de Servicios para el Desarrollo Rural CECADER*. 2007;
 20. Martínez N, Almaguer G, Vázquez-alvarado P, Figueroa A. Análisis fitoquímico de *Jatropha dioica* y determinación de su efecto antioxidante y quimioprotector sobre el potencial genotóxico de ciclofosfamida , daunorrubicina y metilmetanosulfonato evaluado mediante el ensayo cometa [*Phytochemical analysis of Jatr*. 2014;
 21. Silva Belmares, Yesenia, Rivas Morales, Catalina, Viveros Valdez, Ezequiel, de la Cruz Galicia, Maria Guadalupe, Carranza Rosales P. Antimicrobial and Cytotoxic Activities from *Jatropha dioica* Roots. *Pakistan J Biol Sci*. 2014;

22. Silva Mares, David, Torres López Ernesto, Rivas Estilla Ana M, Cordero Pérez Paula, Waksman Minsky, Noemí, Rivas Galindo VM. Plants from Northeast Mexico with Anti-HSV Activity. 2013;8(3).
23. López Guerrero JG. Estudio In vitro de la actividad antiviral de *J. dioica* contra el virus de hepatitis C (VHC) y el virus del Dengue (DENV-2). Universidad Autónoma de Nuevo León; 2017.
24. Dominguez, X.A, Cano, G, Franco, R, Villarreal, A.M., Watson, W.H., Zabel V. Riolozarione, a new class of diterpene from *Jatropha dioica* Var. *Sessiliflora*. 1979;(7651):7651.
25. Melchor Martínez EM. Estudio de la Biogénesis terminal de Riolozatriona por métodos computacionales. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2017.
26. Chavarria Estrada YD. Obtención de derivados de Riolozatriona y evaluación de su actividad antiherpética in vitro. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2017.
27. Tamez Fernández JF. Desarrollo de una formulación tópica de Riolozatriona y evaluación de su actividad contra VHS-1 in vivo. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2017.
28. Álvarez ÁL, Habtemariam S, Juan-badaturuge M, Jackson C, Parra F. In vitro Anti HSV-1 and HSV-2 Activity of *Tanacetum vulgare* Extracts and Isolated Compounds : An Approach to their Mechanisms. 2011;301(December 2010):296–301.
29. Nocchi Requena, Samara, Pereira Companhoni, Mychelle Vianna, Palazzo de Mello JC. Antiviral Activity of Crude Hydroethanolic Extract from *Schinus terebinthifolia* against Herpes simplex Virus Type 1. *Planta Med*. 2016;
30. Gescher K, Kühn J, Hafezi W, Louis A, Derksen A, Deters A, et al. Fitoterapia Inhibition of viral adsorption and penetration by an aqueous extract from *Rhododendron ferrugineum* L . as antiviral principle against herpes simplex virus type-1. *Fitoterapia* [Internet]. 2011;82(3):408–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2010.11.022>
31. Donalisio M, Nana HM, Ngono Ngane RA, Gatsing D, Tiabou Tchinda A, Rovito R, et al. In vitro anti-herpes simplex virus activity of crude extract of the roots of *nauclea latifolia* smith (rubiacaceae). *BMC Complement Altern Med* [Internet].

- 2013;13(1):1. Available from: BMC Complementary and Alternative Medicine
32. Álvarez ÁL, del Barrio G, Kourí V, Martínez PA, Suárez B, Parra F. In vitro anti-herpetic activity of an aqueous extract from the plant *Phyllanthus orbicularis*. *Phytomedicine*. 2009;16(10):960–6.
 33. De Sousa Cardozo FTG, Camellini CM, Mascarello A, José Rossi M, José Nunes R, Monte Barardi CR, et al. Antiherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. *Antiviral Res* [Internet]. 2011;92(1):108–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.07.009>
 34. Su CT, Hsu JTA, Hsieh HP, Lin PH, Chen TC, Kao CL, et al. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. *Antiviral Res*. 2008;79(1):62–70.
 35. Fernandez Romero JA, Del Barrio Alonso G, Romeu Alvarez B, Gutierrez Y, Valdes VS, Parra F. In vitro antiviral activity of *Phyllanthus orbicularis* extracts against herpes simplex virus type 1. *Phytother Res*. 2003;17(8):980–2.
 36. Benzekri R, Bouslama L, Papetti A, Hammami M, Smaoui A, Limam F. Anti HSV-2 activity of *Peganum harmala* (L.) and isolation of the active compound. *Microb Pathog* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2018 Jun 19];114:291–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401017310860>
 37. Kutluay SB, Doroghazi J, Roemer ME, Triezenberg SJ. Curcumin inhibits herpes simplex virus immediate-early gene expression by a mechanism independent of p300/CBP histone acetyltransferase activity. *Virology* [Internet]. 2008 Apr 10 [cited 2018 Aug 26];373(2):239–47. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682207007982>
 38. Chuanasa T, Phromjai J, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Suzuki M, Pramyothin P, et al. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: Mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. *Antiviral Res*. 2008;80(1):62–70.
 39. Pongmuangmul S, Phumiamorn S, Sanguansermisri P, Wongkattiya N, Fraser IH, Sanguansermisri D. Anti-herpes simplex virus activities of monogalactosyl diglyceride and digalactosyl diglyceride from *Clinacanthus nutans*, a traditional Thai herbal medicine. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2018 Jun 18];6(3):192–7. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169115309643>

40. Lin L, Chen T, Chung C, Noyce RS, Grindley TB, McCormick C, et al. Hydrolyzable Tannins (Chebulagic Acid and Punicalagin) Target Viral Glycoprotein-Glycosaminoglycan Interactions To Inhibit Herpes Simplex Virus 1 Entry and Cell-to-Cell Spread □. 2011;85(9):4386–98.
41. de Oliveira A, Prince D, Lo C-Y, Lee LH, Chu T-C. Antiviral activity of theaflavin digallate against herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2018 Jun 18];118:56–67. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016635421500073X>
42. Zhang Y, But PP-H, Ooi VE-C, Xu H-X, Delaney GD, Lee SHS, et al. Chemical properties, mode of action, and in vivo anti-herpes activities of a lignin–carbohydrate complex from *Prunella vulgaris*. *Antiviral Res* [Internet]. 2007 Sep 1 [cited 2018 Aug 15];75(3):242–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354207002781>